Original Article

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 11, Number 4 (September - October)

Journal homepage: www.ijmm.ir

# Study the antimicrobial effect of three marine sponges (*Dysidea* sp.) collected at Persian Gulf on some pathogenic bacteria in planktonic and biofilm forms

**Homa Hamayeli, Mehdi Hasanshahian, Abdolhamid Namaki Shoshtari, Majid Askari Hesni**

Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Bahonar of University of Kerman, Kerman, Iran

Downloaded from ijmm.ir at 1:45 +0330 on Monday December 17th 2018

## *Article Information*

**Article history:**
Received: 2016/12/22
Accepted: 2017/07/24
Available online: 2017/09/12

**Article Subject:**
Antimicrobial Substances

**IJMM 2017; 11(4): 45-56**

**Corresponding author:**

**Dr. Mehdi Hasanshahian**

**Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Bahonar of University of Kerman, Kerman, Iran**

**Tel: 0989132906971**

**Email:**
**hassanshahi@gmail.com**

## *Abstract*

**Background and Aims:** Marine sponges have specific ability to growth in complex conditions deal with microorganisms by production of secondary metabolites. These metabolites can be used to degrade and inhibit the formation of microbial biofilms. Eliminating biofilms is important from the industrial and health aspect.

**Materials and Methods:** In this study the antimicrobial effects of methanol: dichloromethane (1:1) extracts of three marine sponges in *Dysidea* sp genus collected in 2015 at Persian Gulf, were studied against 6 human pathogenic bacteria. The minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC) of each extracts was determined. In biofilm level, the destruction of biofilm and inhibition of biofilm production by each extract was carried out separately.

**Results:** The results of this study showed that the *Dysidea* $sp_c$ have the highest inhibitory effect on planktonic form of studied bacteria. The maximum inhibitory effect on biofilm formation related to extracts of *Dysidea* $sp._a$ in 12.5 mg/mL concentration against *B. cereus* and the minimum inhibitory effect in this concentration against *P. aeroginosa*. The highest destructive biofilm effect of *Dysidea* $sp._c$ extract was observed in 6.25 mg/mL against *K. pneumonia* and lowest destruction in 12.5 mg/mL concentration was recorded against *B. cereus.*

**Conclusions:** The results obtained in this research confirmed that each marine sponges have different inhibitory effect against tested bacteria. This difference can be related to production of bioactive compounds and symbiosis microorganisms with these sponges.

**KeyWords:** Sponges, Pathogenic bacteria, Antimicrobial, Extracts, Persian Gulf

Copyright © 2017 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

Final

**How to cite this article**:

Hamayeli H, Hasanshahian M, Namaki Shoshtari A, Askari Hesni M. Study the antimicrobial effect of three marine sponges (*Dysidea* sp) collected at Persian Gulf on some pathogenic bacteria in planktonic and biofilm forms. Iran J Med Microbiol. 2017; 11 (4): 45-56

مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۱۱ – شماره ۴ – مهر و آبان ۱۳۹۶

Journal homepage: www.ijmm.ir

# بررسی اثر ضد میکروبی سه گونه اسفنج دریایی *Dysidea* sp. جمع‌آوری‌شده از خلیج‌فارس بر روی برخی باکتری‌های پاتوژن به‌صورت منفرد و بیوفیلم

هما حمایلی، مهدی حسن شاهیان، عبدالحمید نمکی شوشتری، مجید عسکری حصنی

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران

**اطلاعات مقاله**

**تاریخچه مقاله**

**دریافت: ۱۳۹۵/۱۰/۰۲**

**پذیرش: ۱۳۹۶/۰۵/۰۲**

**انتشار آنلاین: ۱۳۹۶/۰۶/۲۱**

**موضوع:**

مواد ضد میکروبی

**IJMM 1396; 11(4): 45-56**

**نویسنده مسئول:**

**دکتر مهدی حسن شاهیان**

**گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران**

**تلفن:** ۰۹۸۹۱۳۲۹۰۶۹۷۱

**پست الکترونیک:**

**hassanshahi@gmail.com**

## چکیده

**زمینه و اهداف:** اسفنج‌های دریایی باقابلیت تولید برخی متابولیت‌های ثانویه، توانایی زندگی در شرایط پیچیده دریایی و مقابله با میکروارگانیسم‌ها را دارند. از این متابولیت‌ها می‌توان در جهت تخریب و ممانعت از تشکیل بیوفیلم‌های میکروبی استفاده نمود. از بین بردن بیوفیلم‌ها از جنبه صنعتی و سلامتی دارای اهمیت می‌باشد.

**مواد و روش کار:** در این مطالعه، اثر ضد میکروبی عصاره متانولی: دی کلرومتانی (۱:۱) سه گونه اسفنج دریایی از جنس *Dysidea* sp. جمع‌آوری‌شده درسال ۱۳۹٤ از خلیج‌فارس بر روی ٦ باکتری پاتوژن انسانی انجام گردید. در ابتدا با تعیین حداقل غلظت ممانعت کنندگی (MIC) و سپس تعیین حداقل غلظت کشندگی (MBC) هر یک از عصاره‌ها مشخص شد. در سطح بیوفیلم میکروبی، آزمون تخریب بیوفیلم تشکیل‌شده و مهار تشکیل بیوفیلم توسط هرکدام از عصاره‌ها به‌صورت مجزا انجام پذیرفت.

**یافته‌ها:** نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که اسفنج *Dysidea sp c* بیشترین اثر مهاری را بر روی فرم منفرد باکتری‌های موردمطالعه داشت. بیشترین اثر مهاری تشکیل بیوفیلم عصاره *Dysidea sp.a* در غلظت ۱۲/۵ *mg/mL* بر باکتری *باسیلوس سرئوس* و کمترین درصد مهار نیز در همین غلظت اما بر باکتری *پسودوموناس آئروژینوزا* تعیین گردید. بیشترین اثر تخریب بیوفیلم تشکیل‌شده عصاره *Dysidea sp.c* در غلظت ٦/۲۵ *mg/mL* و بر باکتری *کلبسیلا پنومونیه* بوده و همچنین کمترین این اثر در غلظت ۱۲/۵ *mg/mL* بر باکتری *باسیلوس سرئوس* تعیین گردید.

**نتیجه‌گیری:** نتایج این تحقیق تأیید کردند که هرکدام از گونه‌های اسفنج دریایی فعالیت ضدمیکروبی متفاوتی برعلیه باکتری‌های این پژوهش از خود نشان دادند که می‌تواند به دلیل تفاوت در تولید ترکیبات بیواکتیو و یا میکروارگانیسم‌های همزیست با آن‌ها باشد.

**کلمات کلیدی:** اسفنج، باکتری بیماری‌زا، ضد میکروبی، عصاره، خلیج‌فارس

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

## مقدمه

بیوتیپ‌های دریایی حدود سه‌چهارم سطح زمین را اشغال کرده‌اند و تأثیرات بسیار زیادی بر اکوسیستم‌های هم‌جوار و همچنین شرایط اقتصادی، اجتماعی، معیشتی و حتی شرایط درمانی بشر دارند (۱). در طول تاریخ نشان داده‌شده، که بیشتر فعالیت‌های بیولوژیکی سیاره ما در اقیانوس‌ها شکل‌گرفته است. تعدادی از ترکیبات فعال بیولوژیکی با میزان متفاوتی از عملکردها، ازجمله ضد تومور، ضد سرطان، ضد میکروتوبول، سیتوتوکسیک، محافظت در برابر نور و همچنین خواص آنتی‌بیوتیکی و ضد رسوب، از منابع دریایی امروزه جداشده است (۲). با توجه به تنوع موجودات دریایی و زیستگاه آن‌ها، محصولات طبیعی دریایی شامل طیف گسترده‌ای از مواد شیمیایی مانند ترپن‌ها، پلی‌کتیدها، استوژنین‌ها، پپتیدها و آلکالوئیدها با ساختارهای متفاوت هستند (۳).

اسفنج‌ها از شاخه پوریفرا، از اجدادشان متازوآها که در ۸۰۰-۷۰۰ میلیون سال پیش وجود داشته‌اند، تکامل‌یافته‌اند (۴). پراکنش وسیعی از مناطق جزر و مدی تا هزاران متر از اعماق اقیانوس دارند. آن‌ها موجوداتی فیلتر کننده هستند که از باکتری‌ها تغذیه می‌کنند و با داشتن منافذ کوچک متعدد در سطح، اجازه می‌دهند آب واردشده و از طریق یکسری از کانال‌ها



Downloaded from ijmm.ir at 1:45 +0330 on Monday December 17th 2018

Downloaded from ijmm.ir at 1:45 +0330 on Monday December 17th 2018

که در آن میکروارگانیسم‌ها و ذرات خورده شده فیلتر می‌شوند، گردش کند. به‌این‌ترتیب اسفنج‌ها دائماً در معرض جمعیت بزرگی از میکروب‌های موجود در آب، شامل پاتوژن‌های فرصت‌طلب و میکروارگانیسم‌های رسوبات هستند. با این حال آن‌ها، اعضاء بسیار موفق‌تری از موجودات دریایی می‌باشند که از عفونت‌های باکتریایی کمی رنج می‌برند. اگرچه عملکرد اکولوژیکی متابولیت‌های تولیدشده توسط آن‌ها تاکنون شناخته‌نشده است اما آن‌ها توانایی تولید ترکیبات شیمیایی غیرمعمول را دارند. به‌طور عمده سه رده اسفنج به نام‌های Calcarea (۵ راسته و ۲۴ خانواده)، Demospongiae (۱۵ راسته و ۹۲ خانواده) و Hexactinellida (۶ راسته و ۲۰ خانواده) وجود دارند. تاکنون بیش از حدود ۱۵۰۰۰ گونه از آن‌ها شناسایی‌شده‌اند اما تنوع واقعی آن‌ها احتمالاً بیشتر از این می‌باشد. بسیاری از آن‌ها ساکن محیط‌زیست دریایی هستند و تنها حدود ۱ درصد در آب‌های شیرین حضور دارند. اغلب گونه‌ها در کلاس Demospongiae جای گرفته‌اند (۶، ۵). به دلیل عدم وجود اندام دفاعی فیزیکی در اسفنج‌ها، متابولیت‌های ثانویه نقش عامل دفاعی را برای آن‌ها ایفا می‌کنند. این متابولیت‌ها در پروسه‌های حیاتی موجود نقشی نداشته و در شرایط خاص مانند محدودیت در منابع غذایی و یا رقابت در اکوسیستم مفید واقع می‌شوند. در حقیقت هرگونه اسفنج با توجه به موقعیت زیستی، برنامه خاص تولید متابولیت ثانویه خود را اجرا می‌کند. اغلب زیستگاه‌های اسفنج‌های دریایی دارای بیوماس و باقیمانده غذایی بالا هستند که بنابراین بستر مناسبی به جهت رشد میکروارگانیسم‌ها فراهم می‌گردد. به‌این‌ترتیب یکی از تهدیدکنندگان بقاء اسفنج‌ها، باکتری‌ها هستند و به همین علت آن‌ها ترکیباتی با ویژگی ضد باکتریایی تولید می‌کنند (۸، ۷).

بیوفیلم‌ها، مکانیسم‌هایی با ساختار پیچیده هستند که از طریق تعدادی از گونه‌های باکتریایی قادر به رشد، تماس نزدیک و اتصال محکم با سطح و بهبود روابط بین سلولی می‌باشند (۹). در حقیقت، با توجه به میکروارگانیسم و شکل سیستم ضد میکروبی، باکتری در ساختار بیوفیلم می‌تواند بیش از هزار بار نسبت به باکتری‌های منفرد مشابه خود در برابر فشار اعمال‌شده از سوی ترکیبات ضدمیکروبی، قوی‌تر و مقاوم‌تر باشد (۱۰).

هدف از انجام این پژوهش بررسی اثر ضد میکروبی غلظت‌های مختلف عصاره اسفنج‌های دریایی سه گونه اسفنج از جنس *Dysidea sp.* بر فرم منفرد باکتری‌های پاتوژن و تعیین حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC)، بررسی اثر غلظت‌های مختلف این عصاره‌ها بر تشکیل بیوفیلم و ساختار بیوفیلم تشکیل‌شده باکتری‌های پاتوژن می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

### میکروارگانیسم‌ها

باکتری‌های موردمطالعه در این پژوهش شامل: باکتری‌های گرم مثبت؛ *باسیلوس سرئوس* (ATCC۱۲۹۸ ) و *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC)۱۱۸۹ و هم‌چنین باکتری‌های گرم منفی؛ *اشریشیا کلی* (ATCC۳۵۲۱۸ )، *آسینتو باکتر* (ATCC۱۶۱۱)، *سودوموناس آئروژینوزا* (ATCC۲۷۸۵۳ ) و *کلبسیلا پنومونیه* (ATCC۷۰۰۶۰۳ ).

### جمع‌آوری اسفنج‌های دریایی و عصاره‌گیری

نمونه‌های موردمطالعه در این پژوهش در سال ۱۳۹۴ از عمق ۱۲-۱۰ متری جزیره تنب کوچک (*Dysidea* sp.*a*) و جزیره هنگام (*Dysidea* sp.*b*) و (*Dysidea* sp.*c*) *واقع* در خلیج‌فارس به روش غواصی (SCUBA) جمع‌آوری و سپس در داخل آب دریا و بر روی یخ قرار داده‌شده و به آزمایشگاه منتقل گردیدند. در شکل ۱ تصاویر مربوط به هرگونه اسفنج نشان داده‌شده است. شناسایی اسفنج‌ها بر اساس روش Hopper انجام شد (۱۱). در آزمایشگاه نمونه‌های زنده جداسازی و تا زمان شروع آزمایش در دمای ۲۲- فریز شدند. عصاره‌گیری به روش ماسراسیون تغییریافته و حلال ترکیبی متانول و دی کلرومتان (۱:۱) انجام شد. هرکدام از اسفنج‌ها ابتدا به قطعات کوچک‌تر برش داده‌شده و به مدت ۲۴ ساعت در حلال غوطه‌ور گردیدند. سپس با استفاده از کاغذ واتمن شماره یک مخلوط صاف گردید. پس از تبخیر حلال در دمای اتاق عصاره موردنظر به دست آمد (۱۱).

Final Proof

Downloaded from ijmm.ir at 1:45 +0330 on Monday December 17th 2018

شکل (۱): تصاویر اسفنج‌های دریایی a) *Dysidea* sp.$_a$ b) *Dysidea* sp.$_b$ c) *Dysidea* sp.$_c$

## تعیین میزان اثربخشی عصاره‌ها به روش انتشار دیسک

غلظتی معادل ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره و حلال متانول و دی‌کلرومتان تهیه گردید. در هریک از محلول عصاره‌های مورد آزمایش چند عدد دیسک بلانک (پادتن طب) با قطر ۶/۴ میلی‌متر واردشده و درنهایت دیسک‌ها توسط پنس و در شرایط آسپتیک از محلول عصاره خارج و در پلیت استریل خشک شدند (۱۲). در این مطالعه دیسک‌های آغشته به حلال‌های مصرفی به‌عنوان شاهد برای این آزمایش بودند. کشت چمنی با سوسپانسیون میکروبی معادل کدورت ۰/۵ مک فارلند بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار (شرکت Merck) انجام و دیسک‌های مذکور بر روی پلیت قرار داده‌شده، انکوبه گردیدند. قطر هاله مهاری اندازه‌گیری و ثبت گردید.

## تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC)

MIC با روش براث دایلوشن و طبق پروتکل Clinical & Laboratory Standards Institute (۲۰۰۳) معین شد. رقت‌های مختلف عصاره شامل ۸ رقت mg/mL ۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵، ۳/۱۲، ۱/۵۶ و ۰/۷۸ بوده است. به هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر از رقت‌های تهیه‌شده اضافه شد. کدورتی معادل ۰/۵ مک فارلند از هر باکتری تهیه گردید.۵۰ میکرولیتر از کدورت ۰/۵ مک فارلند هر باکتری به ۱۰ میلی‌لیتر محیط مولر هینتون استریل (شرکت Merck) اضافه گردید. از سوسپانسیون حاصل، ۵۰ میکرولیتر به هر چاهک دارای رقت‌های متفاوت عصاره ریخته شد. هر چاهک دارای تقریباً $۲/۵\times۱۰^{۴}$ سلول باکتری می‌باشد. غلظت نهایی عصاره در هر چاهک به ترتیب mg/mL ۸۰، ۴۰، ۲۰، ۱۰، ۵، ۲/۵، ۱/۲۵ و ۰/۶۲۵ محاسبه گردید. جذب نوری میکروپلیت پس از ۱۸ ساعت انکوباسیون توسط دستگاه الیزا ریدر (Bioteck) (ELX_800) در طول‌موج ۶۳۰ نانومتر تعیین و ثبت شد. کمترین غلظتی از عصاره که رشد باکتری در آن مهارشده بود به‌عنوان MIC انتخاب شد (۱۳). از چاهک‌های تیمار تست MIC، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر بر محیط مولر هینتون آگار فاقد عصاره قرارگرفته و به کمک Glass spreader استریل در سطح پلیت پخش شد. پلیتی که از چاهک با کمترین غلظت عصاره آلوده‌شده و باکتری پس از یک دوره انکوباسیون در آن رشد نکرد به‌عنوان MBC تعیین گردید (۱۴).

## تعیین میزان هیدروفوبیسیته سطحی باکتری‌های موردمطالعه

یکی از مهم‌ترین عوامل مؤثر بر قدرت تشکیل بیوفیلم توسط باکتری‌ها، میزان هیدروفوبیسیته سطح سلول است. این معیار در باکتری‌های موردمطالعه با انجام آزمون Bacterial Adhesin To Hydrocarbon بررسی گردید. برای انجام آزمون BATH، ابتدا یک کشت ۲۴ ساعته از باکتری‌ها بر محیط نوترینت آگار انجام شد. سپس یک لوپ از هر باکتری به لوله حاوی ۹ میلی‌لیتر به بافر سالین فسفات استریل وارد و ورتکس انجام شد تا جذب نوری اولیه سوسپانسیون حاصل در طول‌موج ۶۰۰ نانومتر به مقدار ۰/۳-۰/۲ برسد. سپس به هر لوله مقدار ۲۰۰ میکرولیتر هگزادکان اضافه و ورتکس شدید انجام شد. بعدازآن لوله‌ها به مدت ۱۰ دقیقه و بدون حرکت در دمای ۳۰ درجه سلسیوس انکوبه گردید. ازآنجاکه لایه هگزادکان بر روی سوسپانسیون میکروبی قرار گرفت، برای تعیین جذب ثانویه یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون لایه زیرین برداشت‌شده و جذب نوری آن در ۶۰۰ نانومتر تعیین گردید. با توجه به مقادیر جذب‌های اولیه و ثانویه، میزان هیدروفوبیسیته سطحی هر باکتری از فرمول زیر محاسبه شد:

Final Proof

Downloaded from ijmm.ir at 1:45 +0330 on Monday December 17th 2018

$$BATH = \frac{OD1 - OD2}{OD1} \times 100$$

در این فرمول $OD_1$ مقدار جذب نوری اولیه و $OD_2$ مقدار جذب نوری ثانویه سوسپانسیون میکروبی در طول‌موج ۶۰۰ نانومتر است. طبق فرمول هرچه میزان $OD_2$ کمتر از $OD_1$ باشد BATH بزرگ‌تر خواهد بود (۱۵).

### تعیین اثر مهاری عصاره‌ها بر تشکیل بیوفیلم

در این پژوهش از روش میکروپلیت تیتر استفاده شد. چاهک‌های تیمار حاوی مقدار برابری از رقت‌های عصاره‌های اسفنج و سوسپانسیون میکروبی و چاهک کنترل حاوی سوسپانسیون میکروبی بود. سوسپانسیون میکروبی معادل کدورت ۱ مک فارلند تهیه گردید. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از میزان اثربخشی عصاره‌ها در مراحل قبل، سه رقت متوالی mg/mL ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵ از عصاره‌های دریایی مورد آزمایش تهیه و مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از هر رقت به چاهک‌های تیمار عصاره میکروپلیت ۹۶ خانه وارد شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی به چاهک‌های تیمار افزوده گردید. غلظت نهایی هر عصاره در چاهک معادل mg/mL ۱۲/۵، ۶/۲۵ و ۳/۱ محاسبه گردید. میکروپلیت مذکور به‌صورت بدون حرکت انکوبه گردید (۱۶). پس از گذشت زمان انکوباسیون میکروپلیت بارنگ آمیزی کریستال ویوله بررسی شد. جذب نوری چاهک‌ها به‌وسیله دستگاه الیزا ریدر و در طول‌موج ۶۳۰ نانومتر خوانده شد (۱۷). درصد کاهش بیوفیلم از طریق جذب نوری چاهک‌های تیمار شده، کنترل و شاهد با توجه به فرمول محاسبه شد (۱۸).

$$Reduction\ Percent = \left[\frac{(C-B)-(T-B)}{(C-B)}\right] \times 100$$

میانگین جذب نوری چاهک‌های کنترل=C میانگین جذب نوری چاهک‌های شاهد=B

میانگین جذب نوری چاهک‌های تیمار شده=T

### تعیین اثر تخریبی عصاره‌ها بر بیوفیلم‌های تشکیل‌شده

از روش Nostro و همکاران استفاده شد (۱۹). در این سنجش ابتدا بیوفیلم تشکیل و سپس عصاره‌های موردبحث بر آن اثر داده شد. به‌منظور بررسی قابلیت هر عصاره در حذف ساختارهای بیوفیلمی تشکیل‌شده از رنگ‌آمیزی کریستال ویوله و همانند تعیین اثر مهاری عصاره بر تشکیل بیوفیلم انجام گردید.

## یافته‌ها

### تعیین میزان اثربخشی عصاره‌ها به روش انتشار دیسک

در جدول ۱ قطر هاله‌های عدم رشد عصاره‌های سه گونه اسفنج نشان داده می‌شود. درروش دیسک پلیت عصاره اسفنج گونه *Dysidea* sp.$_a$ هاله عدم رشد تنها در مورد *استافیلوکوکوس اورئوس* و *آسینتوباکتر* دیده شد. در مورد عصاره اسفنج گونه *Dysidea* sp.$_b$ هاله مهاری در رابطه با تمامی باکتری‌های مورد آزمون به‌جز *استافیلوکوکوس اورئوس* مشاهده گردید. عصاره اسفنج گونه *Dysidea* sp.$_c$ بر هر ۶ باکتری موردمطالعه دارای اثر بوده است.

**جدول۱: قطر هاله عدم رشد عصاره‌ها به روش انتشار دیسک**

| باکتری / اسفنج‌ها | *Dysidea* sp.$_a$ | Dysidea sp.$_b$ | *Dysidea* sp.$_c$ |
|---|---|---|---|
| | انتشار دیسک | | |
| *استافیلوکوکوس اورئوس* | ۱۱±۱/۳ SD | - | ۱۰±۰/۸ SD |
| *باسیلوس سرئوس* | - | ۱۷±۱/۱ SD | ۱۵±۰/۶ SD |
| *پسودوموناس آئروژینوزا* | - | ۱۰±۰/۷ SD | ۱۴±۱/۲ SD |
| *اشریشیا کلی* | -* | ۸±۰/۵ SD | ۷±۰/۹ SD |
| *کلبسیلا پنومونیه* | - | ۱۳±۰/۶ SD | ۱۵±۰/۸ SD |
| *آسینتو باکتر* | ۹±۱/۶ SD | ۱۲±۱/۲ SD | ۹±۱/۳ SD |

*: عدم مشاهده هاله مهاری

Final Proof

Downloaded from ijmm.ir at 1:45 +0330 on Monday December 17th 2018

## تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی

حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی هر یک از عصاره‌های اسفنج به‌طور جداگانه بر روی باکتری‌های پاتوژن بررسی شد. نتایج حاصله از این آزمون در جدول (۲) آمده است. همان‌طور که در این جدول دیده می‌شود، بیشترین غلظت مهارکنندگی و غلظت کشندگی مربوط به عصاره اسفنج *Dysidea* sp.$_a$ می‌باشد.

**جدول ۲: مقادیر MIC و MBC باکتری‌های موردبررسی**

| باکتری / نمونه دریایی | *استافیلوکوکوس اورئوس* | | *باسیلوس سرئوس* | | *سودوموناس آئروژینوزا* | | *اشریشیا کلی* | | *کلبسیلا پنومونیه* | | *آسینتوباکتر* | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | MIC mg/mL | MBC mg/mL | MIC mg/mL | MBC mg/mL | MIC mg/mL | MBC mg/mL | MIC mg/mL | MBC mg/mL | MIC mg/mL | MBC mg/mL | MIC mg/mL | MBC mg/mL |
| *Dysidea* sp.$_a$ | ۲۰ | ۴۰ | ۴۰ | ۸۰ | ۴۰ | ۸۰ | ۲۰ | ۴۰ | ۴۰ | ۸۰ | ۱۰ | ۴۰ |
| *Dysidea* sp.$_b$ | ۴۰ | ۸۰ | ۴۰ | ۸۰ | ۲۰ | ۴۰ | ۱۰ | ۲۰ | ۱۰ | ۲۰ | ۵ | ۲۰ |
| *Dysidea* sp.$_c$ | ۲۰ | ۸۰ | ۴۰ | ۸۰ | ۲۰ | ۴۰ | ۱۰ | ۴۰ | ۵ | ۱۰ | ۱۰ | ۲۰ |

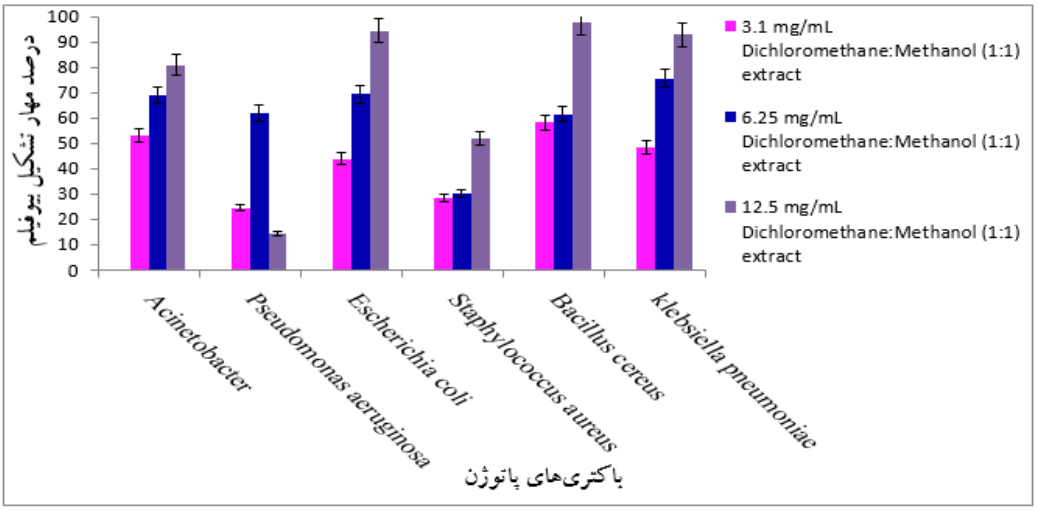
## تعیین میزان هیدروفوبیسیته سطحی باکتری‌های موردمطالعه

مقادیر BATH به‌دست‌آمده برای هر باکتری به این شرح می‌باشد: *آسینتوباکتر* (۶۸/۱۲٪)، *باسیلوس سرئوس* (۶/۲۵٪)، *استافیلوکوکوس سرئوس* (۴۲/۱۲٪)، *سودوموناس آئروژینوزا* (۲۶/۶۳٪)، *اشریشیا کلی* (۹/۱۵٪) و*کلبسیلا پنومونیه* (۲۲/۰۳٪).

## تعیین اثر مهاری عصاره‌ها بر تشکیل بیوفیلم

### عصاره اسفنج *Dysidea* sp.$_a$

توانایی هر یک از غلظت‌های مختلف عصاره این اسفنج در مهار تشکیل بیوفیلم باکتری‌های موردمطالعه در شکل (۲) آمده است. بر اساس نتایج به‌دست‌آمده، بیشترین اثر مهاری تشکیل بیوفیلم این عصاره در غلظت ۱۲/۵ mg/mL بر باکتری *باسیلوس سرئوس* و کمترین درصد مهار نیز در همین غلظت اما بر باکتری *پسودوموناس آئروژینوزا* تعیین گردید.

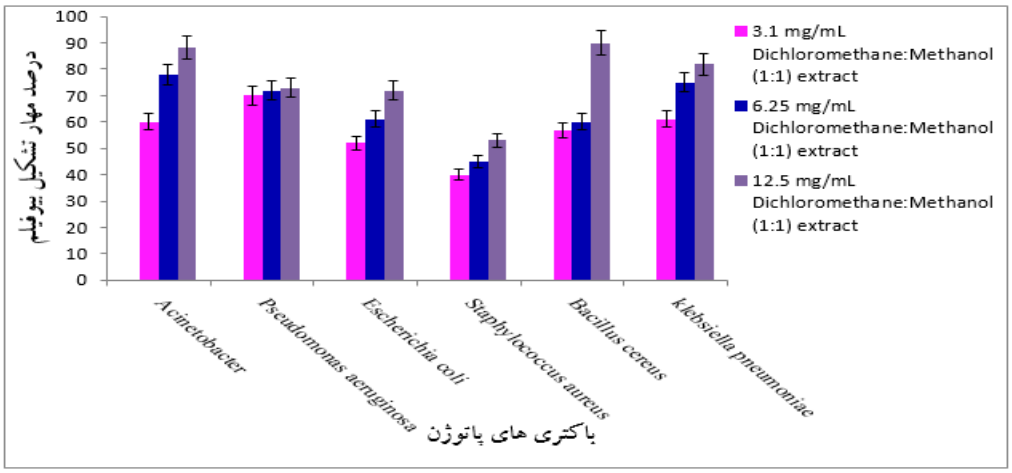



**شکل ۲: مقایسه اثر مهاری عصاره *Dysidea* sp.$_a$ بر تشکیل بیوفیلم باکتری‌های موردمطالعه**

Downloaded from ijmm.ir at 1:45 +0330 on Monday December 17th 2018

### عصاره اسفنج *Dysidea* sp.$_b$

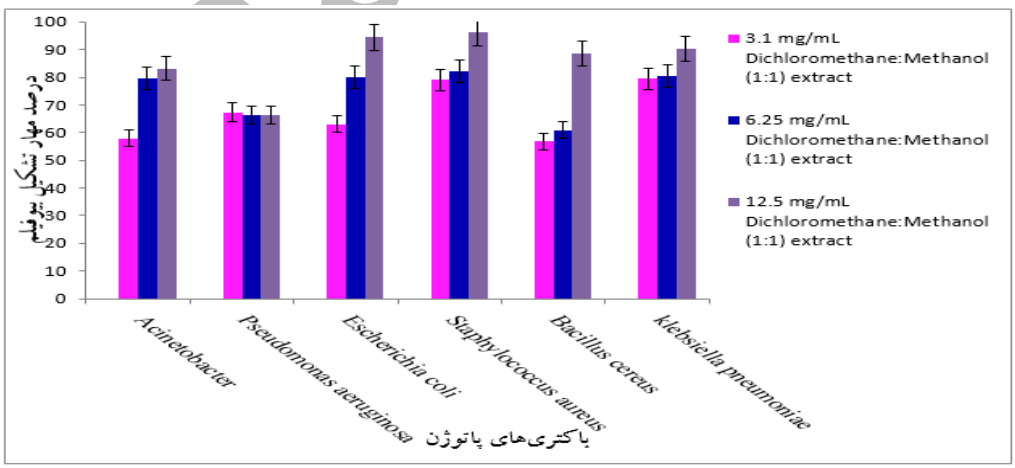
توانایی هر یک از غلظت‌های مختلف عصاره این‌گونه اسفنج در مهار تشکیل بیوفیلم باکتری‌های موردمطالعه در شکل (۳) مشاهده می‌گردد. درنتیجه اطلاعات به‌دست‌آمده در این آزمون، بیشترین اثر مهاری تشکیل بیوفیلم عصاره این اسفنج در غلظت ۱۲/۵ mg/mL بر باکتری*باسیلوس سرئوس* و نیز کمترین درصد مهاری از بین باکتری‌های موردمطالعه در غلظت ۳/۱ mg/mL بر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس*اعمال‌شده است.




**شکل ۳: مقایسه اثر مهاری عصاره *Dysidea* sp.$_b$ بر تشکیل بیوفیلم باکتری‌های موردمطالعه**

### عصاره اسفنج *Dysidea* sp.$_c$

توانایی هر یک از غلظت‌های مختلف عصاره این‌گونه اسفنج در مهار تشکیل بیوفیلم باکتری‌های موردمطالعه در شکل (۴) مشاهده می‌گردد. درنتیجه اطلاعات به‌دست‌آمده در این آزمون، بیشترین اثر مهاری تشکیل بیوفیلم عصاره این اسفنج در غلظت ۱۲/۵ mg/mL بر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و نیز کمترین درصد مهاری از بین باکتری‌های موردمطالعه در غلظت mg/mL ۳/۱ بر باکتری *باسیلوس سرئوس* اعمال‌شده است.



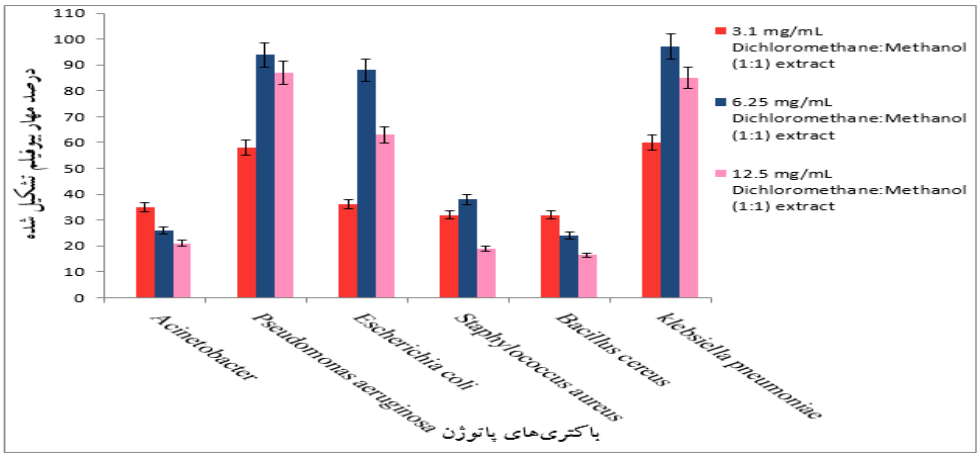

**شکل ۴: مقایسه اثر مهاری عصاره *Dysidea* sp.$_c$ تشکیل بیوفیلم باکتری‌های موردمطالعه**

Downloaded from ijmm.ir at 1:45 +0330 on Monday December 17th 2018

## تعیین اثر تخریبی عصاره‌ها بر بیوفیلم‌های تشکیل‌شده

### عصاره اسفنج *Dysidea* sp.*a*

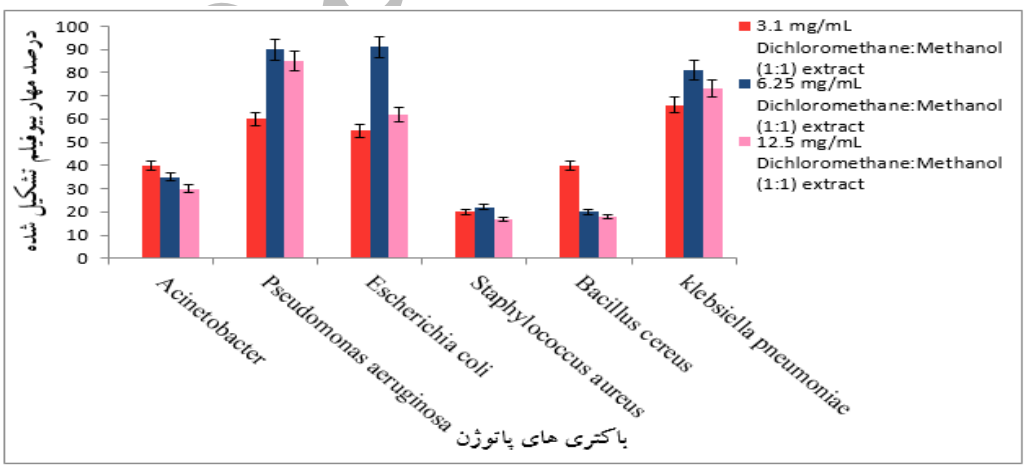
قابلیت هر یک از غلظت‌های مختلف عصاره این اسفنج در تخریب ساختارهای بیوفیلمی باکتری‌های موردمطالعه در شکل (۵) نشان شده است. طبق نتایج به‌دست‌آمده، این عصاره دریایی در غلظت ۶/۲۵ mg/mL بر باکتری *کلبسیلا پنومونیه* بیشترین و در غلظت ۱۲/۵ mg/mL بر باکتری *باسیلوس سرئوس* کمترین اثر تخریبی بیوفیلم تشکیل‌شده را داشته است.




**شکل ۵: مقایسه اثر تخریبی عصاره *Dysidea* sp. *a* بر بیوفیلم تشکیل‌شده باکتری‌های موردمطالعه**

### عصاره اسفنج *Dysidea* sp. *b*

توانایی هر یک از غلظت‌های مختلف عصاره اسفنج در تخریب ساختارهای بیوفیلمی باکتری‌های موردمطالعه در شکل (۶) مشاهده می‌گردد. با توجه به اطلاعات کسب‌شده بیشترین اثر تخریب بیوفیلم تشکیل‌شده در غلظت ۶/۲۵ mg/mL و بر باکتری *اشریشیا کلی* بوده و همچنین کمترین این اثر در غلظت ۱۲/۵ mg/mL بر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* تعیین گردید.

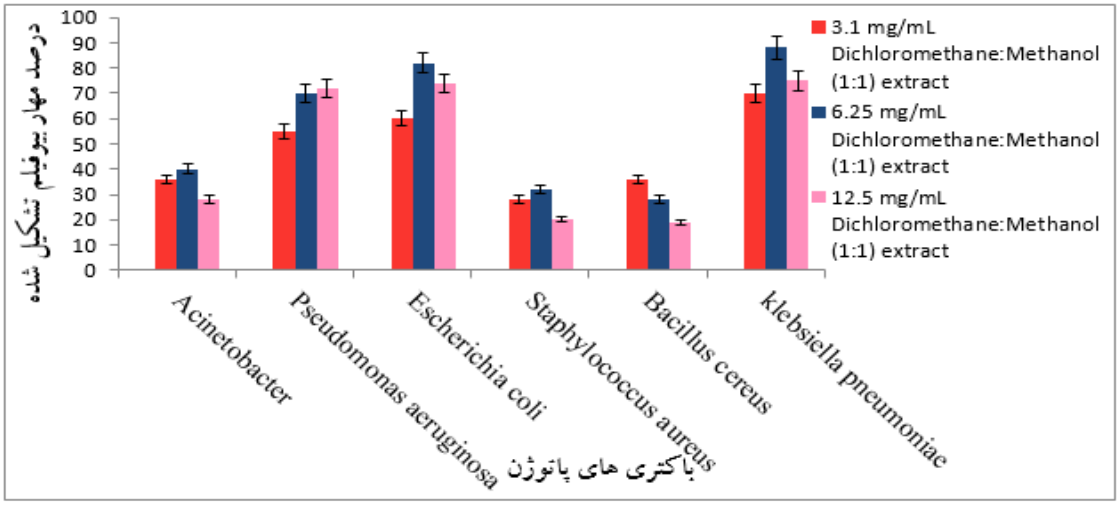



**شکل ۶: مقایسه اثر تخریبی عصاره *Dysidea* sp. b بر بیوفیلم تشکیل‌شده باکتری‌های موردمطالعه**

Downloaded from ijmm.ir at 1:45 +0330 on Monday December 17th 2018

**عصاره اسفنج *Dysidea* sp. *c***

توانایی هر یک از غلظت‌های مختلف عصاره اسفنج در تخریب ساختارهای بیوفیلمی باکتری‌های موردمطالعه در شکل (۷) مشاهده می‌گردد. با توجه به اطلاعات کسب‌شده بیشترین اثر تخریب بیوفیلم تشکیل‌شده در غلظت ۶/۲۵ mg/mL و بر باکتری *کلبسیلا پنومونیه* بوده و همچنین کمترین این اثر در غلظت ۱۲/۵ mg/mL بر باکتری *باسیلوس سرئوس* تعیین گردید.




**شکل ۷: مقایسه اثر تخریبی عصاره *Dysidea* sp. *c* بر بیوفیلم تشکیل‌شده باکتری‌های موردمطالعه**

## بحث

در بررسی که توسط Muller و همکاران انجام گرفت، مشخص گردید که از ۵۰۰ گونه اسفنج که موردبررسی و آزمایش قرارگرفته بودند بیش از ۵۰۰۰ ترکیب با خواص بیولوژیک جداسازی و شناسایی‌شده است (۲۰).

مطابق با این پژوهش، Kelman و همکاران در بررسی فعالیت ضدمیکروبی اسفنج صخره *Amphimedonviridis* از دریای سرخ، از حلال دی‌کلرومتان: متانول به جهت عصاره‌گیری و جداسازی میکروارگانیسم‌های همزیست با اسفنج استفاده نمودند (۲۱). Nazemi و همکاران در بررسی اسفنج *Iophon laevistylus* از جزیره Faro در خلیج‌فارس نشان دادند که عصاره آبی این اسفنج هیچ‌گونه فعالیت آنتی‌باکتریایی نداشته، اما عصاره متانولی و دی‌اتیل اتری فعالیت ضدمیکروبی قابل‌توجهی علیه باکتری‌های *اشرشیاکلی* و *باسیلوس* داشته است (۲۲). همچنین نتایج به‌دست‌آمده این بررسی درروش دیسک دیفیوژن، گویای این مطلب است که استفاده از حلال قطبی: غیر قطبی به جهت عصاره‌گیری مطلوب می‌باشد. Boobathy و همکاران فعالیت متوسطی از عصاره متانولی و آبی یک‌گونه اسفنج علیه پاتوژن‌های انسانی مانند *پسودوموناس آئروژینوزا*، *اشریشیاکلی*، *ویبریو پاراهمولیتیکوس* و *ویبریو کلره* را نشان دادند (۲۳). در این تحقیق نیز اغلب عصاره‌های بررسی‌شده دارای اثر ضد میکروبی علیه هر ۶ پاتوژن انسانی، ازجمله باکتری‌های *سودوموناس آئروژینوزا* و *اشریشیا کلی* بوده‌اند. گمان می‌رود تفاوت در آزمون‌ها و بررسی‌های مختلف به نوع حلال و روش عصاره‌گیری و نیز همچنین گونه و جنس اسفنج دریایی بررسی‌شده بستگی دارد.

در سال ۲۰۱۴ Manjusha و همکاران در طی تحقیق بر روی یک‌گونه اسفنج به این نکته اشاره داشتند که اجتماعات باکتریایی اسفنج‌ها دارای فعالیت ضدمیکروبی قابل‌توجهی در برابر پاتوژن‌های چشم انسان هستند (۲۴). در این مطالعه به جداسازی و شناسایی میکروارگانیسم‌های همزیست با اسفنج‌های موردبررسی پرداخته نشده است. به همین دلیل نمی‌توان به‌طورقطع اظهار نمود که اثرات ضدمیکروبی مشاهده‌شده منحصر به ترکیبات بیواکتیو تولیدشده توسط اسفنج دریایی می‌باشد و این احتمال نیز وجود دارد که میکروارگانیسم‌های همزیست با آن‌ها مسبب بروز این اثرات ضدمیکروبی باشند. همان‌گونه که Thakur و Muller موفق به جداسازی باکتری *سودوموناس* از

اسفنج دریایی *Dysidea* sp. گردیدند که این باکتری در شرایط بازی تولید رنگ‌دانه‌ای با خاصیت ضد باکتریایی می‌کند (۵).

تابه‌حال باکتری‌های *باسیلوس*، *ویبریو*، *سودوآلتروموناس*، *سودوموناس*، *استرپتومایسز دریایی* و *سیتوفاگا* جداشده از آب دریا، رسوبات، جلبک‌ها و بی‌مهرگان دریایی برای تولید عوامل فعال زیستی شناسایی‌شده هستند. آن‌ها قادر به تولید مشتقات ایندول (کوتین وان و ویولاکتین)، آلکالوئیدها (پرودیجینین و آمین تامی)، پلیین، ماکرولیدها، پپتیدها و ترپنوئیدها می‌باشند (۲۵).

درحالی‌که میزان MIC اسفنج‌های جنس *Dysidea* sp. در محدوده ۴۰-۵ mg/mL نشان داده‌شده است، Govinden و همکاران با بررسی خصوصیات ضد باکتریایی اسفنج‌های دریایی از آب‌های ماریتیوس و با استفاده از حلال ترکیبی متانول و دی کلرومتان (۱:۱) چنین اظهار می‌دارند که عصاره خام اسفنج دریایی موردبحث بیشترین میزان MIC را در محدوده غلظت ۲/۵۵-۵/۰۹mg/mL نشان دادند که احتمالاً به این دلیل است که عصاره حاوی مخلوطی از ترکیبات فعال و غیرفعال می‌باشد بنابراین MIC بالاتر مورد انتظار است. این پژوهش فرضیه غنای شیمیایی اسفنج‌ها را تائید می‌کند و بیان می‌دارد که طیف گسترده‌ای از فعالیت ضدمیکروبی این اسفنج‌ها احتمالاً به دلیل حضورسسترترپن‌ها، تری‌ترپن‌ها، آلکالوئیدها و تانن‌های شناسایی‌شده در عصاره می‌باشد (۲۶).

Nursyam و همکاران در سال ۲۰۱۳ با بررسی یک‌گونه اسفنج به نام *Geodia* sp. در اندونزی اثرات ضدمیکروبی قابل قبولی علیه باکتری‌های *اشریشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* گزارش نمودند. با آنالیز GCMS از این نمونه اسفنج ترکیباتی مانند نرپنوئید، آستروئید و اسید چرب شناسایی گردید. آن‌ها همچنین اظهار داشتند که عصاره اسفنج تازه نسبت به عصاره اسفنج خشک‌شده دارای اثر ضدمیکروبی بیشتری بوده است که نشان می‌دهد برخی از ترکیبات مؤثر در عصاره قابل تبخیر می‌باشند (۲۷). ما در این پژوهش عصاره‌گیری را از هر سه نمونه اسفنج *Dysidea* sp. تازه انجام دادیم که می‌توان نتیجه گرفت اثرات نشان داده‌شده احتمالاً در بیشترین و بهترین وضعیت بوده‌اند.

Salehi و همکاران در سال ۲۰۱۴ با بررسی پروتئین‌های بیواکتیو اسفنج به‌عنوان عامل ضد باکتریایی چنین بیان می‌دارد که، کاهش در فعالیت ضدمیکروبی هنگامی‌که با دیگر غلظت‌های عصاره مقایسه می‌شود احتمالاً به دلیل ذخیره‌سازی ایجاد می‌شود. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که پروتئین بیواکتیو بی‌ثبات است و در غلظت‌های پائین پروتئین (۴۰۰-۴۰ mg/mL) فعالیت ضد باکتریایی کمی را نشان می‌دهد (۲۸). همانند آنچه ما در اغلب نتایج حاصل از اثر مهاری هر ۳ عصاره *Dysidea* sp. بر تشکیل بیوفیلم میکروبی مشاهده کردیم از میان سه غلظت مورد آزمون، کمترین اثر مهاری مربوط به کمترین غلظت یعنی ۳ mg/mL بوده است.

Nazemi و همکاران در سال ۲۰۱۷ با بررسی اثر ضدمیکروبی عصاره دی اتیل اتر از اسفنج *Dysidea pallescens* در خلیج‌فارس، MBC برابر ۱۰ mg/mL را برای باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* گزارش نموده‌اند (۲۹). اسفنج‌های دریایی موردبررسی در این پژوهش دارای MBC برابر ۸۰-۴۰mg/mL در رابطه با باکتری مذکور بوده‌اند. این تفاوت در میزان MBC احتمالاً به دلیل تفاوت در حلال مصرفی و یا گونه مورد آزمون بوده است.

تفاوت در کلیه نتایج به‌دست‌آمده این سه گونه اسفنج دریایی در سطح منفرد و بیوفیلم، نشان‌دهنده تفاوت در میزان فعالیت ضدمیکروبی آن‌ها در برابر باکتری‌های مختلف می‌باشد که می‌تواند به دلیل تفاوت در ارگانیسم‌های همزیست باشد. چنانکه Newbold و همکاران نیز ضمن بررسی فعالیت ضدمیکروبی عصاره اسفنج دریای کارائیب چنین اظهار می‌دارند که، الگوی فعالیت ضدمیکروبی ۱۵ تا از ۱۶ گونه اسفنج بررسی‌شده متفاوت بوده است و اعلام می‌دارند که گونه‌های مختلف، متابولیت ضد باکتری مشابهی تولید نمی‌کنند (۷). Khakshoor و Pazooki با بررسی خود بر روی فعالیت باکتریسیدال و ضد قارچی عصاره‌های متفاوت از یک‌گونه اسفنج از خلیج‌فارس بیان می‌دارند، باکتری‌های گرم مثبت (۷۲٪) نسبت به باکتری‌های گرم منفی (۶۵٪) به بسیاری از عصاره‌ها حساس‌تر بوده‌اند (۳۰).

ضمن این پژوهش کمترین اثر تخریبی هر سه عصاره دریایی بر بیوفیلم تشکیل‌شده باکتری‌های *باسیلوس سرئوس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* مشاهده گردید. هیچ‌گونه پژوهشی مبنی بر فعالیت ضدمیکروبی عصاره اسفنج‌های دریایی بر ساختار بیوفیلمی پاتوژن‌های انسانی یافت نشد. به نظر می‌رسد مطالعه



Downloaded from ijmm.ir at 1:45 +0330 on Monday December 17th 2018

Final Proof

پیش رو اولین گزارش از اسفنج‌های دریایی خلیج‌فارس در این حیطه کاری باشد.


### تقدیر و تشکر

این مقاله از پایان‌نامه دوره کارشناسی ارشد مصوب و دفاع شده در دانشکده علوم دانشگاه باهنر کرمان استخراج‌شده است. نویسندگان بر خود لازم می‌دانند مراتب تشکر صمیمانه خود را از مسئولین و اساتید دانشگاه باهنر کرمان، هیئت‌داوران پایان‌نامه و تمامی دوستان، همکاران و عزیزانی که ما را در انجام و ارتقاء کیفی این پژوهش یاری دادند، اعلام نمایند.


### تعارض منافع

بین نویسندگان و مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران هیچ‌گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

## References


1. Bhatnagar I, Kim S. Immense Essence of Excellence: Marine Microbial Bioactive Compounds. Mar. Drugs 2010; 8 (10):2673-2701.
2. Hardoim CCP, Costa R. Microbial Communities and Bioactive Compounds in Marine Sponges of the Family Irciniidae. Mar. Drugs 2014; 12(10):5089-5122.
3. PremAnanda T, Bhata AW, Yogesh S, UpalRoyb S, Siddharthb J, Sarmaa SP. Antimicrobial activity of marine bacteria associated with sponges from the waters off the coast of South East India. Microbiol Res 2006; 161(3): 252-262.
4. Jimeno J, Faircloth G, Fernández Sousa-Faro JM, Scheuer P, Rinehart K. New marine derived anticancer therapeutics- Ajouney from the sea to clinical trials. Mar. Drugs 2004; 2(1): 14-29.
5. Thomas TRA, Kavlekar DP, Loka Bharathi PA. Marine Drugs from Sponge-Microbe Association. Mar. Drugs 2010;8 (4): 1417-1468.
6. Newbold RW, Jensen PR, Fenical W, Pawlik JR. Antimicrobial activity of Caribbean sponge extracts. Aquat Microb Ecol 1999; 19: 279-284.
7. JavanbakhtYousefi S, Ghasemi FM, Amir Mozaffari N. Biological evaluation of bioactive substances produced in bacteria isolated from coastal waters of the Caspian. J. Biolog. Sci 2009;3 (4): 2008-5982.
8. Amraouia BEI, Biardb JF, Urizc MJ, Rifaia S, Fassouane A. Antifungal and antibacterial activity of Porifera extracts from the Moroccan Atlantic coasts. J Mycol Med 2010;20 (1): 70-74.
9. Simoes M, Simoes L, Vieira MJ. A review of current and emergent biofilm control strategies. LWT -FST 2010; 43: 573-583.
10. Srey S, Jahid IK, Sang-Do HA. Biofilm formation in food industries: A food safety concern. Food Control 2013;31 (2):572-585.
11. Hooper JNA, Soest RWM. Systema Porifera. A Guide to the Classification of Sponges the End of a Beginning. Boll. Mus. Ist. Biol. Univ. Genova 2004; 68 : 19-38.
12. Andrews JM. BSAC standardized disc susceptibility testing method. J Antimicrob Chemother 2004; 53:713-28.
13. Rotilie CA, Fass RJ, Prior RB, Perkins RL. Microdilution Technique for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria. Antimicrob Agents Chemother 1975; 7(3): 311-315.
14. Baron EJ, Peterson LR, Finegold SM. Methods for testing antimicrobial effectiveness; In Bailey and Scott's diagnostic microbiology; Mosby-Year Book: St. Louis, MI, 1994; pp. 168-193.
15. Rosenberg M, Rosenberg E. Role of adherence in growth of *Acinetobactercalcoaceticus* RAG-1 to hexadecane. J Bacteriol 1981; 148 (1): 51-57.
16. Cramton SE, Gerke C, Cotz F. In vitro methods to study biofilm formation. Methods Enzymol 2001; 336: 239-255.
17. Jabra-Rizk MA, Meiller TF, James CE, Shirtliff ME. Effect of farnesol on Staphylococcus aureus biofilm formation and antimicrobial susceptibility. Antimicrob. Agents Chemother 2006; 50 :1463-1469.
18. Sonak S, Bhosle NB. A simple method to assess bacterial attachment to surfaces. Biofouling. 1995; 9:31-38.
19. Nostro A, Bisignano G, Cannatelli MA, Crisafi G, Germano MP, Alonzo V. Effects of *Helichrysumitalicum* extract on growth and enzymatic activity of *Staphylococcus aureus*. Int J Antimicrob Agents 2001; 17(6):517-520.


Downloaded from ijmm.ir at 1:45 +0330 on Monday December 17th 2018

Final Proof

Downloaded from ijmm.ir at 1:45 +0330 on Monday December 17th 2018


20. Muller WE, Grebenjuk WELE, Pennec G, Schroeder H, Brummer F, Hentschel I. Sustainable production of bioactive compounds by sponges-cell culture and gene cluster approach. Mar Biotechnol (NY) 2004; 6 (2):105-117.

21. Kelman D, Kashman Y, Rosenberg E, Ilan M, Ifrach I, Loya Y. Antimicrobial activity of the reef sponge *Amphimedonviridis* from the Red Sea: evidence for selective toxicity. Aquat Microb Ecol 2001; 24: 9-16.

22. 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. Iran J Fish Sci 2014; 13 (4):823-833.

23. Boopathy S, Kumar TTA, Kathiresan K. Isolation of symbiotic bacteria and bioactive proteins from the marine sponge, *Callyspongia diffusa*. Indian J. Biotechnol 2009; 8(3):272-275.

24. Manjusha WA, Johnson JA, Citarsu T, Rejin Prasad JJ. Isolation and identification of *Bacillus Pumilus* LD-B1 with antimicrobial and anti-cancer activities from the marine sponge *Axinella sp.* Collected from Kanyakumari coast. JOBB 2014;2 (5):141-149.

25. Soliev AB, Hosokawa K, Enomoto K. Bioactive Pigments from Marine Bacteria: Applications and Physiological Roles. Evid Based Complement Alternat Med 2011; 1-17.

26. Govinden-Soulange J, Marie D, Kauroo S, Beesoo R, Ramanjooloo R. Antibacterial Properties of Marine Sponges from Mauritius Waters. Trop J Pharm Res 2014; 13(2): 249-254.

27. Nursyam H, Andayani S, Salis H. Antibacterial Activities of Sponge Extracts (*Geodia* sp.) Against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. Glob. J. Med. Plant Res 2013;1 (1): 88-92.

28. Salehi A, Patong R, Ahmad A. Isolation and characterization of some kind bioactive proteins sponge as antibacterial agent. IJSTR 2014;3 (2): 233-236.

29. Nazemi M, Moradi Y, Rezvani Gilkolai F, Ahmaditaba MA, Gozari M, Salari Z. 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): 200-209.

30. Khakshoor MS, Pazooki J. Bactericidal and fungicidal activities of different crude extracts of *Gelliodes carnosa* (sponge, Persian Gulf). Iran J Fish Sci 2014;13 (3): 776-784.


Final Proof