Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Journal of Utilization and Cultivation of Aquatics

Online ISSN: 2345-427X
Print ISSN: 2345-4288

Effect of Seasonal Variation on Antimicrobial Properties of *Niphates furcata* Sponge in Kish Island

Esmaeil Zare Mehrabadi[*1], Mohamad Reza Rahmani[2], Kamran Rezayi Tavabe[3], Melika Nazemi[4]

1. Corresponding Author, Faculty of Environmental Sciences, Environmental Protection Organization, Karaj, Iran. E-mail: esmaeil.zare90@gmail.com
2. Faculty of Environmental Sciences, Environmental Protection Organization, Karaj, Iran. E-mail: irandoe_rahmani@yahoo.com
3. Dept. of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. E-mail: krtavabe@ut.ac.ir
4. Persian Gulf and Oman Sea Ecological Research, Iranian Fisheries Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Bandar Abbas, Iran. E-mail: melikanazemi@yahoo.com

Article Info

Article type:
Full Length Research Paper

Article history:
Received: 04.13.2022
Revised: 04.26.2022
Accepted: 04.30.2022

Keywords:
Antimicrobial extract,
Niphates furcata sponge,
Seasonal variations,
Secondary metabolites

ABSTRACT

Many marine invertebrates, such as sponges, produce secondary metabolites that have some pharmaceutical uses. This study was carried out to determine the antibacterial properties and the effect of seasonal variations on methanolic extracted from sponge *Niphates furcata* against Gram-positive bacteria *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* and Gram negative bacteria *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosus* using broth dilution method. The experiment results showed that methanolic extracts of sponge extracted in summer did not show any antibacterial effect on *E. coli* and *P. aeruginosus* and did not have the ability to inhibit the growth of the mentioned bacteria, and naturally the concentrations determined could not have any bactericidal effect on the gram-negative bacteria of *E. coli* and *Pseudomonas aeruginosus*. In winter, this extract had an inhibitory effect on all four gram positive and gram negative bacteria used in this study, In contrast to methanolic extract from summer, methanolic extract of winter season on *Escherichia coli* had a bactericidal effect, although it did not show any bactericidal effect, similar to that of summer on *Pseudomonas aeruginosus.* Comparison of the data shows that the methanolic extract of *Niphates furcata* sponge has a more severe inhibitory effect on the bacteria than in the winter, although the comparison of the bacterial pathogenic effects in both summer and winter shows similar results, and the concentrations have not shown any bactericidal effect on *Pseudomonas aerosinosis.*

Cite this article: Zare Mehrabadi, Esmaeil, Rahmani, Mohamad Reza, Rezayi Tavabe, Kamran, Nazemi, Melika. 2022. Effect of Seasonal Variation on Antimicrobial Properties of *Niphates furcata* Sponge in Kish Island. *Journal of Utilization and Cultivation of Aquatics*, 11 (2), 87-100.

© The Author(s).
DOI: 10.22069/japu.2022.20107.1646
Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

نشریه بهره‌برداری و پرورش آبزیان

شاپا آنلاین: ۲۳٤٥-٤۲۷X
شاپا چاپی: ۲۳٤٥-٤۲۸۸

تأثیر تغییرات فصلی بر خواص ضد میکروبی اسفنج *Niphates furcata* جزیره کیش (مطالعه موردی)

اسماعیل زارع مهرآبادی*[۱]، محمدرضا رحمانی[۲]، کامران رضایی توابع[۳]، ملیکا ناظمی[٤]

۱. نویسنده مسئول، دانشکده محیط زیست، سازمان حفاظت محیط زیست، کرج، ایران. رایانامه: esmaeil.zare90@gmail.com
۲. دانشکده محیط زیست، سازمان حفاظت محیط زیست، کرج، ایران. رایانامه: irandoe_rahmani@yahoo.com
۳. گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه: krtavabe@ut.ac.ir
٤. پژوهشکده اکولوژی دریای عمان و خلیج‌فارس، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، بندرعباس، ایران. رایانامه: melikanazemi@yahoo.com

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:
مقاله کامل علمی- پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱٤۰۱/۰۱/۲٤
تاریخ ویرایش: ۱٤۰۱/۰۲/۰٦
تاریخ پذیرش: ۱٤۰۱/۰۲/۱۰

واژه‌های کلیدی:
اسفنج *Niphates furcata*،
تغییرات فصلی،
عصاره ضدمیکروبی،
متابولیت‌های ثانویه

چکیده

بسیاری از بی‌مهرگان دریایی مانند اسفنج‌ها متابولیت‌های ثانویه تولید می‌کنند که این ترکیبات کاربرد دارویی دارند. به‌منظور تعیین خواص ضد باکتریایی و تأثیر تغییرات فصلی بر عصاره اسفنج گونه *Niphates furcata* جزیره کیش نسبت به باکتری‌های گرم مثبت *Bacillus subtilis* و *Staphylococcus aureus* و گرم منفی *Escherichia coli* و *Pseudomonas aeruginosa* با استفاده از روش رقت لوله‌ای استفاده شد. نتایج آزمایش نشان داد که عصاره متانولی استخراج شده از اسفنج در فصل تابستان برای باکتری‌های *Escherichia coli* و *Pseudomonas aeruginosa* هیچ‌گونه اثر ضدباکتریایی نداشت. عصاره استخراج شده در فصل زمستان بر روی هر چهار گونه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی مورد استفاده در این پژوهش، اثر بازدارندگی داشته‌اند و برخلاف عصاره متانولی استخراج شده از فصل تابستان، عصاره متانولی فصل زمستان بر روی باکتری *Escherichia coli* اثر کشندگی داشته و مشابه فصل تابستان بر روی باکتری *Pseudomonas aeruginosa* اثر باکتریوسیدی از خود نشان نداد. عصاره متانولی اسفنج *Niphates furcata* در فصل زمستان اثر مهارکنندگی بیش‌تری نسبت به باکتری‌های یاد شده دارد. مقایسه اثر کشندگی باکتری‌ها در هر دو فصل تابستان و زمستان نتایج مشابهی را نشان می‌دهند و غلظت‌های تعیین شده هیچ‌گونه اثر باکتریوسیدی بر روی باکتری *Pseudomonas aeruginosa* نشان نداده‌اند.

استناد: زارع مهرآبادی، اسماعیل، رحمانی، محمدرضا، رضایی توابع، کامران، ناظمی، ملیکا (۱۴۰۱). تأثیر تغییرات فصلی بر خواص ضد میکروبی اسفنج *Niphates furcata* جزیره کیش (مطالعه موردی). *نشریه بهره‌برداری و پرورش آبزیان*، ۱۱ (۲)، ۱۰۰-۸۷.
DOI: 10.22069/japu.2022.20107.1646

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

© نویسندگان.

مقدمه

تاکنون نزدیک به ۱۵۰۰۰ ترکیب طبیعی از جانداران دریایی استخراج و شناسایی شده است که از این تعداد ٤٥ ترکیب با خواص دارویی در مراحل آزمایشی پیش بالینی[1] و بالینی[2] قرار دارند (۱). تعداد زیادی از این عصاره‌های استخراج شده که دارای خاصیت درمانی هستند از اسفنج‌ها و میکروارگانیسم‌های همزیست آن‌ها جداسازی شده‌اند (۲).

ترکیبات بسیاری با خواص بیولوژیک از موجودات دریایی مانند مرجان‌ها، خرگوش دریایی، خیار دریایی، خارپوستان، آب‌فشان‌های دریایی، کوسه‌ها و ... استخراج شده است (۳). بررسی‌های انجام شده در رابطه با متابولیت‌های ثانویه آبزیان نشان می‌دهد که بی‌مهرگان و در بین آن‌ها جانداران چسبیده به بستر[3] به‌ویژه اسفنج‌ها بیش‌ترین متابولیت‌های ثانویه با خواص دارویی را از خود ترشح می‌کنند (٤). از آن‌جا که اسفنج‌ها توان جابجایی و مقابله با عوامل مهاجم را ندارند، بنابراین باید طوری عمل نمایند که بتوانند در مقابل عوامل خارجی مانند باکتری‌ها، قارچ‌ها و سایر پاتوژن‌ها مقاومت نماید، بنابراین آن‌ها با تولید متابولیت‌های ثانویه مجهز به یک سیستم ایمنی بسیار شگفت‌انگیز شده‌اند (۵) که بشر امروزه از این ترکیبات شیمیایی استخراج و شناسایی شده از جانداران دریایی که شامل ترکیبات ساده و پیچیده شیمیایی هستند به عنوان ترکیبات دارویی استفاده می‌نماید. از آن‌جا که از مسائل اساسی علوم زیستی دریایی بررسی متابولیت‌های ثانویه و خواص زیستی آبزیان می‌باشد، باید علاوه بر استفاده مستقیم غذایی از آن‌ها به جنبه‌های مختلف بیولوژیک آن‌ها پرداخته شود هم‌چنین با توجه به تأثیر فاکتورهای اکولوژیک بر اجتماعات اسفنج‌ها و تغییرات فیزیولوژیک بر روی آن‌ها احتمال می‌رود عصاره ضد باکتریایی استخراج شده از آن‌ها در دو فصل گرم و سرد تأثیرات متفاوتی داشته باشد. اگرچه بسیاری از آن‌ها می‌توانند نسبت به تغییرات محیطی مقاومت نشان دهند (٦).

مطالعات انجام شده نشان می‌دهد که از سال ۱۹۰۷ تا دهه گذشته ۱۳۱ ترکیب از جانداران دریایی با اثر ضد باکتریایی شناسایی شده است که این تعداد ۵۲ درصد از مولکول‌های ضدعفونی‌کننده و ١٤ درصد شامل ترکیبات سنتز شده در سال ۲۰۰۰ را دربر می‌گیرد. در حالی که در دهه اخیر ۲۵۲ ترکیب استخراج شده از جانداران دریایی و ۷۳ ترکیب سنتز شده از آن‌ها با اثر ضد باکتریایی شناسایی شده است، ارقام فوق نشان‌دهنده اهمیت آبزیان دریایی در خواص ضد باکتریایی و ضدعفونی‌کننده‌ها می‌باشد (۷). آزمایش دیگری که توسط جانسون و همکاران (۲۰۱۲) انجام شد نیز نشان‌دهنده آن بود که اسفنج‌های مورد مطالعه خواص ضد باکتریایی خود روی باکتری‌های گرم مثبت ۷۷ درصد بیش از باکتری‌های گرم منفی نشان می‌دهند (۸).

تاکنون در رابطه با ارزیابی ذخایر اسفنج‌ها در خلیج‌فارس و دریای عمان گزارشی ارائه نشده است، اما مشاهدات غواصان بیانگر آن است تنوع و زیست‌توده این نمونه در منطقه فراوان است. بنابراین با توجه به برنامه‌های موجود در سند راهبردی بیوتکنولوژی کشور و این‌که تاکنون پژوهش‌های انگشت‌شماری در رابطه با خواص بیولوژیک متابولیت‌های ثانویه از منابع دریایی، اسفنج‌ها، انجام گرفته است در این پژوهش به بررسی خواص

1- Preclinical
2- Clinical
3- Sessil

ضدباکتری ترکیبات طبیعی اسفنج *Niphates furcata* از جزیره کیش و مقایسه این خواص در دو فصل تابستان و زمستان پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری: در پژوهش حاضر تأثیر دو متغیر فصلی (تابستان و زمستان) و دو متغیر باکتریایی (گرم مثبت و گرم منفی) بر روی عصاره متانولی استخراج شده از اسفنج گونه *نیفاتس فورکاتا* با استفاده از روش رقت لوله‌ای انجام گرفت. در فصول سرد و گرم سال ۱۳۹۶ نمونه‌های اسفنج *Niphates furcata* از عمق ۱۲-۱۰ متری از جزیره کیش واقع در خلیج‌فارس به روش غواصی[1] جمع‌آوری شدند (شکل ۱). نمونه‌ها شسته و به آزمایشگاه منتقل گردیدند. جهت از بین بردن اپی‌فیت‌های نمونه‌ها و سنگ و شن‌ها جدا شده سپس یخ‌پوشی شده و یک سانتی‌متری بریده شدند و در دمای ۲۴- درجه سلسیوس منجمد و نگهداری شدند. بعد از انجمادزدایی برای عصاره‌گیری آماده شدند.

شکل ۱- محل نمونه‌برداری اسفنج در جزیره کیش، خلیج‌فارس.

عصاره‌گیری: فرآیند خشک کردن نمونه‌ها اسفنج به‌وسیله دستگاه خشک‌کن انجمادی[2] انجام شد سپس نمونه‌های ۱۰ گرمی آسیاب به پودر تبدیل شدند و دو برابر وزن بر روی نمونه‌ها متانول اضافه شد و به‌مدت ۷۲ ساعت در آزمایشگاه در دمای اتاق قرار داده شد. پس از ۷۲ ساعت محلول به‌دست آمده را از صافی گذرانده تا بخش جامد نمونه‌ها از آن جدا شده و آن‌چه باقی ماند، حلال متانولی و ترکیبات جامد موجود در نمونه بود. عصاره به‌دست آمده به دستگاه در دمای ۴۰ درجه سلسیوس و دور rpm۱۴۵ روتاری منتقل گردید، تا حلال (متانول) تبخیر شود (۹).

1- SCUBA
2- Freeze dryer

تعیین حداقل غلظت بازدارندگی[1]: بررسی خواص ضدباکتریایی با استفاده از روش رقت‌سازی در محیط براث[2] به شرح زیر انجام گرفت: سویه‌های باکتری *اشریشیاکلای*[3]، *سودوموناس آئروژینوزا*[4]، *استافیلوکوکوس اورئوس*[5] و *باسیلوس سوبتیلیس*[6] از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی ایران به‌صورت لیوفیلیزه تهیه شدند. ابتدا باکتری‌ها با پاساژ اولیه در محیط مایع کشت داده شده و سپس هر کدام از سویه‌ها در محیط کشت اختصاصی براث حاوی ۵ گرم پپتون، ۳ گرم عصاره گوشت، ۱۵ گرم آگار در یک لیتر آب مقطر، کشت اولیه داده شدند و به‌مدت ۲٤ تا ۷۲ ساعت بر اساس میزان سرعت رشد باکتری‌ها در دمای ۳۷ درجه سلسیوس در انکوباتور قرار داده شدند تا از کلونی‌های تک به‌منظور انجام آزمایش استفاده شود.

پس از رشد باکتری‌ها آن‌ها را از انکوباتور خارج نموده و با استفاده از آنس از کلونی‌های تک ایجاد شده به محیط کشت براث که حاوی؛ ۱ گرم پپتون، ۱ گرم گلوکز، ۲ گرم عصاره مخمر، ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر و ۱۵ میلی‌لیتر فسفات بافر[7] ۷-٦ اتوکلاو شده بود، در لوله‌های آزمایش وارد نموده، این کار را آن قدر تکرار شد تا کدورت محیط براث با کدورت لوله مک فارلند[8] ۰/۵ (معادل ۸ log CFU/ml) یکسان شد. به این منظور با رقیق کردن مایع تلقیح (تا ٦ log CFU/m)، تعداد باکتری‌ها به رقم موردنظر رسانده شد. مایع تلقیح تهیه شده بلافاصله مورد استفاده قرار گرفت.

از لوله فوق که حاوی $۱/۵ \times ۱۰^{٦}$ عدد باکتری بود به مقدار ۱ میلی‌لیتر به هرکدام از لوله‌های استریل اضافه شد، سپس از عصاره متانولی، با غلظت‌های ۵۰، ٤۰، ۳۰، ۲۰، ۱۰، ۵، ۳، ۲، ۱/۵، ۰/۷۵، ۰/۵، ۰/۰۵ و ۰/۰۱ میلی‌لیتر که در محیط براث حل شده بود به مقدار ۱ میلی‌لیتر به لوله‌های فوق افزوده شده و حجم لوله‌ها به ۲ میلی‌لیتر رسانده شد. برای در نظر گرفتن شاهد مثبت از آنتی‌بیوتیک‌های تتراسایکلین و آمپی‌سیلین، با غلظت‌های فوق استفاده شد و به عنوان شاهد منفی به یکی از لوله‌ها ماده فعّال بیولوژیک اضافه نگردید. در داخل یک لوله نیز تنها محیط کشت فاقد ماده مؤثره و باکتری قرار داده شد تا در صورت آلودگی محیطی خطای آزمایش مشخص گردد. سپس سر تمام لوله‌ها با پنبه بسته شد و در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سلسیوس با سه تکرار به مدت ۲٤ ساعت قرار داده شد.

در ادامه آزمایش به‌منظور تعیین توانایی عصاره‌های موردنظر در از بین بردن باکتری‌ها از لوله‌هایی که در آن‌ها کدورت مشاهده نشده بود به مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر به پلیت‌های استریل تزریق نموده و محیط نوترینت آگار به آن اضافه شد (کشت پور پلیت). سپس پلیت‌ها به انکوباتور منتقل و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲٤ ساعت نگهداری شدند. پس از ۲٤ ساعت پلیت‌ها خارج شدند و تعداد کلونی‌های تشکیل شده شمرده شد.

تعیین حداقل غلظت کشندگی[9]: در پلیت‌هایی که باکتری رشد کرده بود بیانگر آن است که عصاره موردنظر تنها توانایی مهار رشد و تکثیر باکتری را دارد، اما در پلیت‌هایی که هیچ‌گونه کلونی مشاهده نشد نشان‌دهنده آن است که ماده موردنظر سبب مرگ

1- MIC (minimum inhibitory concentration)
2- Broth Dilution Method
3- *Escherichiacoli* ATTC 1524
4- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC25619
5- *Staphylococcus aureus* ATCC1764
6- *Bacillus subtilis spizizenii* ATCC6633
7- PBS (Phosphate buffered saline)
8- McFarland 0.5
9- MBC (minimum bactericidal concentration)

باکتری شده است؛ که این مقدار برابر با MBC می‌باشد. تجزیه و تحلیل‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS16 و مقایسه میانگین‌ها با آزمون آنوا یک‌طرفه در سطح معنی‌داری ۵ درصد صورت گرفت.

نتایج

بررسی اثر ضدباکتریایی عصاره اسفنج *Pseudomonas aeruginosa*: در جدول ۱ حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی از رشد باکتری‌ها و در جدول ۲ حداقل غلظت کشندگی باکتری‌های مورد آزمایش عصاره‌های اسفنجی فصل تابستان مشاهده می‌گردد.

جدول ۱- حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی عصاره‌های اسفنجی فصل تابستان

((-) نمونه‌های فاقد کدورت، (+) نمونه‌هایی که کدورت در آن‌ها مشاهده شده).

عصاره اسفنج	*Escherichia coli*	*Pseudomonas aeruginosa*	*Staphylococcus aureus*	*Bacillus subtilis*
متانولی ۰/۰۱ mg/ml	+	+	+	+
متانولی ۰/۰۵ mg/ml	+	+	+	+
متانولی ۰/۱ mg/ml	+	+	+	+
متانولی ۰/۵ mg/ml	+	+	+	+
متانولی ۰/۷۵ mg/ml	+	+	+	+
متانولی ۱/۵ mg/ml	+	+	+	+
متانولی ۲ mg/ml	+	+	+	+
متانولی ۳ mg/ml	+	+	+	+
متانولی ۵ mg/ml	+	+	+	+
متانولی ۱۰ mg/ml	+	+	+	+
متانولی ۲۰ mg/ml	+	+	-	-
متانولی ۳۰ mg/ml	+	+	-	-
متانولی ٤۰ mg/ml	+	+	-	-
متانولی ۵۰ mg/ml	+	+	-	-
آمپی‌سیلین ۰/۰۱ mg/ml	+	+	+	+
آمپی‌سیلین ۰/۰۵ mg/ml	+	+	+	+
آمپی‌سیلین ۰/۱ mg/ml	+	+	+	+
آمپی‌سیلین ۰/۵ mg/ml	+	+	+	+
آمپی‌سیلین ۰/۷۵ mg/ml	-	+	-	+
آمپی‌سیلین ۱/۵ mg/ml	-	-	-	-
آمپی‌سیلین ۲ mg/ml	-	-	-	-
آمپی‌سیلین ۳ mg/ml	-	-	-	-
آمپی‌سیلین ۵ mg/ml	-	-	-	-
آمپی‌سیلین ۱۰ mg/ml	-	-	-	-

ادامه جدول ۱-

عصاره اسفنج	*Escherichia coli*	*Pseudomonas aeruginosa*	*Staphylococcus aureus*	*Bacillus subtilis*
آمپی‌سیلین ۲۰ mg/ml	-	-	-	-
آمپی‌سیلین ۳۰ mg/ml	-	-	-	-
آمپی‌سیلین ٤۰ mg/ml	-	-	-	-
آمپی‌سیلین ۵۰ mg/ml	-	-	-	-
تتراسایکلین ۰/۰۱ mg/ml	+	+	+	+
تتراسایکلین ۰/۰۵ mg/ml	+	+	+	+
تتراسایکلین ۰/۱ mg/ml	+	+	+	+
تتراسایکلین ۰/۵ mg/ml	+	+	+	+
تتراسایکلین ۰/۷۵ mg/ml	-	+	-	+
تتراسایکلین ۱/۵ mg/ml	-	-	-	-
تتراسایکلین ۲ mg/ml	-	-	-	-
تتراسایکلین ۳ mg/ml	-	-	-	-
تتراسایکلین ۵ mg/ml	-	-	-	-
تتراسایکلین ۱۰ mg/ml	-	-	-	-
تتراسایکلین ۲۰ mg/ml	-	-	-	-
تتراسایکلین ۳۰ mg/ml	-	-	-	-
تتراسایکلین ٤۰ mg/ml	-	-	-	-
تتراسایکلین ۵۰ mg/ml	-	-	-	-

با توجه به نتایج جدول ۱؛ حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی از رشد باکتری عصاره متانولی برای باکتری *Escherichia coli* در غلظت‌های معین اثرگذار نبود. آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده به عنوان شاهد مثبت در غلظت ۰/۷۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از رشد باکتری‌ها جلوگیری نموده‌اند. حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی از رشد باکتری عصاره متانولی برای باکتری *Pseudomonas aeruginosa* در غلظت‌های معین اثرگذار نبود. آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده به‌عنوان شاهد مثبت در غلظت ۱/۵ میلی‌لیتر از رشد باکتری‌ها جلوگیری نموده‌اند.

حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی از رشد باکتری عصاره متانولی برای باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* برابر ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر می‌باشد. پادزیست‌های مورد استفاده به‌منظور شاهد مثبت در غلظت ۰/۷۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از رشد باکتری‌ها جلوگیری نموده‌اند. حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی از رشد باکتری عصاره متانولی برای باکتری *باسیلوس سوبتیلیس* برابر ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر می‌باشد. آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین در غلظت ۰/۷۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و هم‌چنین آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین در غلظت ۱/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر هر دو به عنوان شاهد مثبت از رشد باکتری‌ها جلوگیری نموده‌اند.

همان‌طور که از جدول ۲ استنباط می‌گردد در تمام لوله‌های مورد آزمایش کدورت مشاهده گردیده است بنابراین عصاره متانولی، برای باکتری‌های *Escherichia coli* و *Pseudomonas aeruginosa* هیچ‌گونه اثر ضدباکتریایی از خود نشان نداده‌اند و توانایی مهار رشد باکتری یاد شده را نداشته‌اند.

جدول ۲- حداقل غلظت کشندگی باکتریایی عصاره‌های اسفنجی فصل تابستان.

تعداد کلونی	باکتری	غلظت عصاره اسفنجی (MBC)
۰	*Staphylococcus aureus*	متانولی ٤٠ mg/ml
۰	*Bacillus subtilis*	متانولی ۳۰ mg/ml
۰	*Escherichia coli*	آمپی‌سیلین ۱/۵ mg/ml
۰	*Staphylococcus aureus*	آمپی‌سیلین ۱/۵ mg/ml
۰	*Bacillus subtilis*	آمپی‌سیلین ۲ mg/ml
۰	*Pseudomonas aeruginosa*	آمپی‌سیلین ۳ mg/ml
۰	*Escherichia coli*	تتراسایکلین ۱/۵ mg/ml
۰	*Staphylococcus aureus*	تتراسایکلین ۱/۵ mg/ml
۰	*Bacillus subtilis*	تتراسایکلین ۲ mg/ml
۰	*Pseudomonas aeruginosa*	تتراسایکلین ۳ mg/ml

بر اساس جدول ۲؛ حداقل غلظت کشندگی باکتری عصاره متانولی برای باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* برابر ٤٠ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر می‌باشد. آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده به عنوان شاهد مثبت در غلظت ۱/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اثر باکتریوسیدی از خود نشان داده‌اند.

حداقل غلظت کشندگی باکتری عصاره متانولی برای باکتری *باسیلوس سوبتیلیس* برابر ۳۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر می‌باشد. آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده به‌عنوان شاهد مثبت در غلظت ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اثر باکتریوسیدی از خود نشان داده‌اند. عصاره متانولی به‌دلیل این‌که هیچ‌گونه اثر مهارکنندگی باکتری بر روی باکتری‌های گرم منفی ***Escherichia coli*** و ***Pseudomonas aeruginosa*** در فصل تابستان از خود نشان نداد، پس طبیعتاً نمی‌توانست اثر باکتریوسیدی بر روی باکتری‌های مذکور داشته باشد. آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده به عنوان شاهد مثبت در غلظت ۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اثر باکتریوسیدی از خود نشان داده‌اند. در جدول ۳ حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی از رشد باکتری‌های و در جدول ٤ حداقل غلظت کشندگی باکتری‌ها مورد آزمایش عصاره‌های اسفنجی فصل زمستان مشاهده می‌گردد.

جدول ۳- حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی عصاره‌های اسفنجی فصل زمستان
((-) نمونه‌های فاقد کدورت، (+) نمونه‌هایی که کدورت در آن‌ها مشاهده شده).

عصاره اسفنج	*Escherichia coli*	*Pseudomonas aeruginos*	*Staphylococcus Aureus*	*Bacillus subtilis*
متانولی ۰/۰۱ mg/ml	+	+	+	+
متانولی ۰/۰۵ mg/ml	+	+	+	+
متانولی ۰/۱ mg/ml	+	+	+	+
متانولی ۰/۵ mg/ml	+	+	+	+
متانولی ۰/۷۵ mg/ml	+	+	+	+
متانولی ۱/۵ mg/ml	+	+	+	+
متانولی ۲ mg/ml	+	+	+	+
متانولی ۳ mg/ml	+	+	+	+
متانولی ۵ mg/ml	+	+	+	+
متانولی ۱۰ mg/ml	+	+	-	-
متانولی ۲۰ mg/ml	+	+	-	-
متانولی ۳۰ mg/ml	-	+	-	-
متانولی ٤۰ mg/ml	-	+	-	-
متانولی ۵۰ mg/ml	-	-	-	-

مطابق جدول ۳؛ حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی از رشد باکتری عصاره متانولی برای باکتری *Escherichia coli* برابر ۳۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر می‌باشد. آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده به عنوان شاهد مثبت در غلظت ۰/۷۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از رشد باکتری‌ها جلوگیری نموده‌اند. حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی از رشد باکتری عصاره متانولی برای باکتری *Pseudomonas aeruginosa* برابر ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر می‌باشد. آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده به عنوان شاهد مثبت در غلظت ۱/۵ میلی‌لیتر از رشد باکتری‌ها جلوگیری نموده‌اند. حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی از رشد باکتری عصاره متانولی برای باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* برابر ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر می‌باشد. آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده به‌عنوان شاهد مثبت در غلظت ۰/۷۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از رشد باکتری‌ها جلوگیری نموده‌اند. حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی از رشد باکتری عصاره متانولی برای باکتری *باسیلوس سوبتیلیس* برابر ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر می‌باشد. آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده به‌عنوان شاهد مثبت در غلظت ۱/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از رشد باکتری‌ها جلوگیری نموده‌اند.

جدول ٤- حداقل غلظت کشندگی باکتریایی عصاره‌های اسفنجی فصل زمستان.

تعداد کلونی	باکتری	غلظت عصاره اسفنجی
۰	*Escherichia coli*	متانولی ٤٠ mg/ml
۰	*Staphylococcus aureus*	متانولی ٢٠ mg/ml
۰	*Bacillus subtilis*	متانولی ١٠ mg/ml

بر اساس نتایج جدول ٤؛ حداقل غلظت کشندگی باکتری عصاره متانولی برای باکتری ***Escherichia coli*** برابر ٤٠ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر می‌باشد. آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده به‌منظور شاهد مثبت در غلظت ۱/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر خاصیت کشندگی داشته‌اند. حداقل غلظت کشندگی باکتری عصاره متانولی برای باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* برابر ۲۰ میلی‌لیتر می‌باشد. آنتی‌بیوتیک‌های استفاده شده به‌منظور شاهد مثبت در غلظت ۱/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اثر کشندگی باکتری داشته‌اند. حداقل غلظت کشندگی باکتری عصاره متانولی برای باکتری *باسیلوس سوبتیلیس* برابر ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر می‌باشد. آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده به عنوان شاهد مثبت در غلظت ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اثر باکتریوسیدی از خود نشان داده‌اند. عصاره متانولی هیچ‌گونه اثری روی باکتری ***Pseudomonas aeruginosa*** از خود نشان نداد، آنتی‌بیوتیک‌های استفاده شده به‌منظور شاهد مثبت در غلظت ۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اثر کشندگی باکتری داشته‌اند.

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج نشان داد که عصاره متانولی استخراج شده از اسفنج *نیفاتس فورکاتا* در فصل تابستان در مورد باکتری گرم منفی ***Escherichia coli*** در هیچ غلظتی اثر ضد باکتریایی ندارد و نمی تواند از رشد باکتری‌ها جلوگیری کند و قاعدتاً زمانی که عصاره، اثر باکتریواستاتیکی بر روی باکتری مذکور از خود نشان نمی‌دهد پس نمی‌تواند اثر باکتریوسیدی و کشندگی بر روی باکتری مورد نظر داشته باشد. عصاره متانولی استخراج شده از اسفنج *نیفاتس فورکاتا* در فصل زمستان در غلظت ۳۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اثر باکتریواستاتیک روی باکتری ***Escherichia coli*** از خود نشان می‌دهد و در غلظت ٤٠ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اثر باکتریوسیدی دارد.

در مطالعه‌ای که توسط گالنو و مارتینز (۲۰۰۷) در رابطه با خواص ضدباکتریایی عصاره‌های متانولی اسفنج گونه *تاپسنتیا افیرافیدیتس*[1] و عصاره کلروفرمی اسفنج گونه *نیفاتس ارکتا*[2] روی باکتری ***Escherichia coli*** انجام شد این دو گونه در غلظت‌های ۱/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر و ۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر رشد باکتری مذکور را مهار کردند. در آزمایش انجام شده روی عصاره‌های متانولی و دی‌اتیل اتری اسفنج *لفن لیویستیلوس*[3] از جزیره فارور در خلیج‌فارس مشخص گردید که عصاره غیرقطبی در غلظت ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و عصاره قطبی در غلظت ۱/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از رشد باکتری *اشرشیاکلای* ممانعت به عمل نموده و هر دو عصاره در غلظت ۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر سبب مرگ باکتری مذکور می‌گردند (۱۰، ۱۱).

1- *Topsentia ophiraphidites*
2- *Niphates erecta*
3- *Iophon laevistylus*

یکی دیگر از باکتری‌های گرم منفی که مورد بررسی عصاره متانولی اسفنج *نیفاتس فورکاتا* قرار گرفت باکتری ***Pseudomonas aeruginosa*** بود. همان‌طور که نتایج آزمایش‌ها نشان می‌دهند هیچ‌کدام از عصاره‌های فوق که در فصل تابستان تهیه شده بودند روی باکتری مذکور اثر ضدباکتریایی از خود نشان نداده‌اند. اما عصاره متانولی زمستان اسفنج *نیفاتس فورکاتا* در غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از رشد باکتری مذکور ممانعت نموده، اما عصاره متانولی زمستان اسفنج یاد شده روی باکتری ***Pseudomonas aeruginosa*** هیچ‌گونه اثر باکتریوسیدی از خود نشان داده است. در مقایسه‌ای که توسط ناظمی و همکاران بر فعالیت ضدباکتریایی عصاره متانولی خیار دریایی گونه *هولوزوریا لوکوسپیلوتا*[1] با اسفنج گونه *نیفاتس فورکاتا* از جزیره هنگام واقع در خلیج‌فارس انجام دادند، نتایج به‌دست آمده نشان داد عصاره متانولی گونه اسفنج در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی لیتر از رشد باکتری ***Pseudomonas aeruginosa*** ممانعت به عمل آورده و هیچ‌گونه خاصیت باکتریوسیدی از خود نشان نداد، در این آزمایش عصاره متانولی خیار دریایی هیچ‌گونه اثر بازدارندگی و کشندگی باکتری بر روی باکتری ***Pseudomonas aeruginosa*** نداشت (۱۲). در پژوهشی که روی باکتری ***Pseudomonas aeruginosa*** از عصاره خشک متانولی گونه اسفنج از جنس هالیکلونا جمع‌آوری شده از جزیره کرا در مالزی انجام شد مشخص گردید که عصاره متانولی اثر ضدباکتریایی از خود نشان نمی‌دهد (۱۳). بررسی اثر ضدباکتریایی عصاره‌های آبی، متانولی و دی اتیل اتری اسفنج *لفن لیویستیلوس* از جزیره فارور واقع در خلیج‌فارس که توسط ناظمی و همکاران توسط روش براث روی باکتری ***Pseudomonas aeruginosa*** انجام شده بود، نشان داد که هیچ کدام از عصاره‌های مورد آزمایش خواص باکتریواستاتیک و باکتریوسید از خود نشان نمی‌دهند (۹).

مطالعات انجام شده در رابطه با اثر ضدباکتریایی عصاره اسفنجی نسبت به باکتری ***Pseudomonas aeruginosa*** نشان می‌دهد که این باکتری گرم منفی نسبت به عصاره‌های مورد آزمایش بسیار قوی عمل نموده به طوری که در یک مورد عصاره مورد بررسی اثر ضدباکتریایی نسبت به این باکتری را از خود نشان می‌دهد. همان‌طور که نتایج پژوهش انجام شده نشان می‌دهد، تنها عصاره استخراج شده از اسفنج در فصل زمستان اثر باکتریواستاتیکی روی باکتری ***Pseudomonas aeruginosa*** از خود نشان داده است، نتیجه فوق گواه آن است که این عصاره کاندید مناسبی برای تولید آنتی‌بیوتیک برای باکتری ذکر شده نمی‌باشد.

در این پژوهش اثر بیولوژیک ضد باکتری عصاره متانولی اسفنج *نیفاتس فورکاتا* در دو فصل زمستان و تابستان با استفاده از روش براث، روی باکتری‌های گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* و *باسیلوس سوبتیلیس* نیز انجام گرفت. نتایج آزمایش‌ها نشان می‌دهد که عصاره متانولی استخراج شده در فصل تابستان در غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اثر باکتریواستاتیک روی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* از خود نشان می‌دهد و در غلظت ٤٠ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اثر باکتریوسیدی دارد. عصاره متانولی استخراج شده از اسفنج *نیفاتس فورکاتا* در فصل زمستان در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اثر باکتریواستاتیک روی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* از خود نشان می‌دهد و در غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اثر باکتریوسیدی دارد. آزمایش انجام شده روی عصاره‌های متانولی و کلروفنلی گونه‌های اسفنج از جنس هالیکلونا از جزیره کرا در مالزی که اثر ضدباکتریایی روی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* با

1- *Holothuria leucospilota*

استفاده از روش براث مورد ارزیابی قرار گرفته بود مشخص شده که عصاره متانولی در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و عصاره کلروفنلی در غلظت ۳۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از رشد این باکتری جلوگیری می‌نماید (۱۳). باکتری گرم مثبت دیگری که در این پژوهش مورد مطالعه اثر ضدباکتریایی عصاره متانولی در دو فصل زمستان و تابستان اسفنج *نیفاتس فورکاتا* قرار گرفت *باسیلوس سوبتیلیس* بود. نتایج آزمایش‌ها نشان می‌دهد که عصاره متانولی استخراج شده در فصل تابستان از این اسفنج در غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اثر باکتریواستاتیک روی باکتری *باسیلوس سوبتیلیس* از خود نشان می‌دهد و در غلظت ۳۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اثر باکتریوسیدی دارد. عصاره متانولی استخراج شده از اسفنج *نیفاتس فورکاتا* در فصل زمستان در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اثر باکتریواستاتیک روی باکتری *باسیلوس سوبتیلیس* از خود نشان می‌دهد و در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اثر باکتریوسیدی دارد.

بررسی عصاره‌های خشک استخراج شده از اسفنج *لفن لیویستیلوس* روی باکتری *باسیلوس سوبتیلیس* که با استفاده از روش براث انجام گردید نشان می‌دهد که عصاره دی اتیل اتری در غلظت ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و عصاره متانولی در غلظت ۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اثر باکتریواستاتیک را ایجاد نموده و اثر باکتریوسیدی این دو عصاره روی باکتری مذکور به‌میزان ۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مشخص شد، که نشان می‌دهد در باکتری *باسیلوس سوبتیلیس* هر دو عصاره دی اتیل اتری و متانولی به یک میزان اثر کشندگی خود را القا نموده‌اند (۹).

از نتایج آزمایش‌های انجام شده توسط سایر پژوهش‌گران و نتایج حاصل در این پژوهش که اثر ضد باکتریایی اسفنج *نیفاتس فورکاتا* روی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی مورد بررسی قرار داده است چنین برداشت می‌شود که اثر ضد باکتریایی عصاره‌های تهیه شده از این اسفنج مانند سایر اسفنج‌ها روی باکتری‌های گرم مثبت قوی‌تر عمل نموده (در غلظت پایین‌تر اثر نموده است). اثر ضدباکتریایی عصاره‌های مورد آزمایش بر روی باکتری‌های گرم منفی کم‌تر بوده است و تنها عصاره متانولی استخراج شده از اسفنج در فصل زمستان توانایی ممانعت از رشد و تکثیر باکتری را از خود نشان داده است، از آن‌جا که باکتری گرم منفی *اشرشیاکلای* نسبت به باکتری ***Pseudomonas aeruginosa*** ضعیف‌تر می‌باشد این عصاره در غلظت پایین‌تری اثر خود را نشان داده است.

هر یک از گونه‌های باکتری گرم منفی و گرم مثبت مورد مطالعه در این پژوهش دارای ویژگی‌های منحصر به فرد خود هستند که دارای ساختار و ویژگی‌های متفاوتی هستند که این تفاوت می‌تواند مکانیسم‌های مقاومتی را تحت‌تأثیر قرار دهد و به موجب این، می‌توان گفت هر کدام از باکتری‌ها دارای عملکردی متفاوت نسبت به عصاره‌ها بودند، بنابراین تفاوت‌هایی که در ساختار این گونه‌ها است باعث این تفاوت در نتایج شده است (۱۴). یکی از عوامل مهم که باعث ایجاد خاصیت ضد میکروبی در عصاره‌های استخراج شده از اسفنج دریایی شده است، سنتز ترکیبات شیمیایی یا متابولیت‌های ثانویه با ساختار شیمیایی ترپنوئیدی و پپتیدی می‌باشد (۱۲) اما این‌که چرا تأثیر عصاره استخراج شده در فصل تابستان با فصل زمستان متفاوت است دلیل آن را می‌توان به وجود بار آلودگی میکروبی در محیط و یا فصل نمونه‌برداری نسبت داد، زیرا ترکیبات فعال زیستی هوشمندانه و بر اساس شرایط اکولوژیکی–شیمیایی سنتز می‌شوند (۱۵). در ضمن از تفاوت در دیگر پژوهش‌ها و پژوهش حاضر می‌توان به‌دلایل مختلفی اشاره کرد که از جمله آن‌ها روش‌های عصاره‌گیری،

استفاده از حلال‌های متفاوت، گونه اسفنج دریایی و هم‌چنین شرایط اکولوژیکی متفاوت گونه مورد مطالعه است.

نتایج نشان داد که عصاره متانولی استخراج شده از اسفنج *نیفاتس فورکاتا* در فصل تابستان هیچ گونه اثر ضد باکتریایی برای باکتری ***Escherichia coli*** از خود نشان نداده‌اند، تأثیر مشابهی بر اثر ضد باکتریایی برای باکتری ***Pseudomonas aeruginosa*** مشاهده شد. عصاره متانولی تولید شده توانایی مهار رشد باکتری‌های یاد شده را نداشته‌اند و طبیعتاً غلظت‌های تعیین شده نمی‌توانستند بر روی باکتری‌های گرم منفی ***Escherichia coli*** و ***Pseudomonas aeruginosa*** اثر باکتریوسیدی داشته باشند. عصاره متانولی استخراج شده از اسفنج *نیفاتس فورکاتا* در فصل زمستان بر روی هر چهار گونه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی مورد استفاده در این پژوهش، اثر بازدارندگی رشد داشتند و بر خلاف عصاره متانولی استخراج شده از فصل تابستان، عصاره متانولی فصل زمستان بر روی باکتری ***Escherichia coli*** اثر کشندگی داشت هر چند مشابه فصل تابستان بر روی باکتری ***Pseudomonas aeruginosa*** هیچ‌گونه اثر باکتریوسیدی از خود نشان نداد. بررسی فصلی نشان می‌دهد که عصاره متانولی اسفنج فصل زمستان اثر مهارکنندگی شدیدتری نسبت به باکتری‌های یاد شده دارد هر چند که مقایسه اثر کشندگی باکتری‌ها در هر دو فصل تابستان و زمستان نتایج تقریباً مشابهی را نشان می‌دهند و غلظت‌های تعیین شده هیچ‌گونه اثر باکتریوسیدی بر روی باکتری ***Pseudomonas aeruginosa*** نشان نداده‌اند. بررسی متغیرهای باکتریایی در پژوهش حاضر نشان داد که بر خلاف باکتری‌های گرم منفی، هر دو باکتری گرم مثبت رفتاری مشابه در فصول مختلف در برابر عصاره متانولی استخراج شده از اسفنج داشتند و دارای اثر بازدارنده بودند. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که باکتری‌های گرم مثبت پاسخ یکنواخت و شدیدتری به عصاره متانولی استخراج شده از اسفنج مورد مطالعه دارند. در مجموع نتایج پژوهش حاضر نشان داد که اسفنج *نیفاتس فورکاتا* توانایی تولید متابولیت‌های ثانویه با قابلیت استفاده‌های دارویی را دارند.

منابع

1. Newman, D.J., and Cragg, G.M. 2004. Marine natural products and related compounds in clinical and advanced preclinical trails. Jornal of natural products, 67: 8. 1216-1238.
2. Piel, J. 2006. Bacterial symbions: prospects for the sustainable production of invertebrate-drived pharmaceuticals. Current medicinal chemistry, 13: 1. 39-50.
3. Faulkner, D.J. 2001. Marine natural products. Natural Product Reports, 18: 1-49.
4. West, L.M., Northcote, P.T., and Hood, K.A. 2000. Mycalamide D, a new cytotoxic amide from the New Zealand marine sponge Mycale species. Natural Products. 63: 747-749.
5. Rifai, S., Fassouane, A.F., Kijjoa, A., and Van Soest, R. 2004. Antimicrobial activity of untenospongin B, a metabolite from the marine sponge *Hippospongia communis* collected from the Atlantic coast of morocco. Marine Drugs, 2: 3. 147-153.
6. Derakhshesh, N., Savari, A., Doostshenas, B., Dehghan, S., Doraghi, A.M. 2012. Estmating the effect of seasonal variation of environmental factors on biomass of spongs placed on artificial structures of Bahrakan coast (north-west of persian gulf). Journal of Marin Biology. 4: 13. 41-50.

7.Mancini, I., Defant, A., and Guella, G. 2007. Recent synthesis of marine natural products with antibacterial activities. Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry, 6: 1. 17-48.
8.Johnson, J.A., Citarasu, T., and Manjusha, W.A. 2012. Antimicrobial screening and identification of Bioactive compounds present in marine sponge Zygomycale sp. collected from Kanyakumari coast. Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences. 2: 1843-1846.
9.Nazemi, M., Khoshkhoo, Z., Motalebi, A., Karimi, F., and Pishehvarzad, F. 2014. Identification nonpolar component and antibacterial activities of *Iophon laevistylus* from Persian Gulf. International Journal of Enviromental Science and Development. 1: 107-110.
10.Galeano, E., and Martinez, A. 2007. Antimicrobial activity of marine sponges from Urabá Gulf, Colombian Caribbean region. Medical Mycology. 17: 21-24.
11.Nazemi, M., PishehVarzad, F., Motalebi, A., and Ahmadzadeh, A. 2012. Investigation of antibacterial properties of *Axinella sinoxea* sponge from Lark Island, Persian Gulf. Aquatic Ecology Quarterly, 1: 4. 65-54.
12.Nazemi, M., Tamaddoni Jahromi, S., Salari, Z., and Gozari, M. 2016. Comparison of antibacterial activity of methanolic extract of sea cucumber *Holothuria leucospilota* and sponge *Niphates furcata* in the Persian Gulf. Journal of Marine Biology. Eighth Year, 32: 72-65.
13.Darah, I., Lim, CL., Nurul Aili, Z., Nor Afifah, S., and Shaida Fariza, S. 2011. Effects of methanolic extract of a soft sponge, Haliclona sp. on bacterial cells: structural degeneration study. International journal of comprehensive pharmacy. 7: 1-6.
14.Farjami, B., Nematollahi, M.A., Moradi, Y., Irajian, G., Nazemi, M., Ardebili, A., and Pournajaf, A. 2013. Antibacterial activity of the sea cucumber *Holothuria leucospilota*. International Journal of Molecular and Clinical Microbiology, 3: 1. 225-230.
15.Detmer, S., Maurice, C.R., Franssen, R.O., and Johannes, T. 2005. Marine Sponges as Pharmacy. Marine Biotechnology. 7: 142-162.