Journal of Marine Medicine
Autumn 2023, Volume 5, Issue 3
Pages: 136-144
10.30491/5.3.136

Antibacterial effect of methanolic extract of marine sponge *Haliclona implexa* from Oman Sea against two strains of food pathogenic bacteria (*Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*)

Ali Taheri [1*], Sara Kazemi-Khanaposhtani [2], Rouhollah Zare [3]

[1]*Associate Professor, Faculty of Marine Sciences, Chabahar Maritime University, Chabahar, Iran*
[2] *MSc. Student, Faculty of Marine Sciences, Chabahar Maritime University, Chabahar, Iran*
[3] *Assistant Professor, Faculty of Marine Sciences, Chabahar Maritime University, Chabahar, Iran*

Received: 12 May 2023 **Accepted:** 5 September 2023

Abstract

Background and Aim: To fight food pathogenic microorganisms, it is necessary to search for new antimicrobial compounds. Marine sponges are potential sources of new antimicrobial agents due to secondary metabolites. This study investigated the antibacterial effect of methanolic extract of *H. implexa* sea sponge collected from Chabahar.

Methods: This study investigated at two concentrations of 3 and 5 mg/ml of the methanolic extract against two foodstuffs bacteria of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* by disc diffusion sensitivity test, minimum inhibitory concentration (MIC), and minimum bactericidal concentration (MBC). Statistical analysis was done with One-Way Analysis of Variance and comparison of means with Tukey's test.

Results: According to the results, the highest effects were obtained on concentrations of 5 mg/ml with 11.03±1.7 and 12.033±0.702 mm diameters of non-growth halos for *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*, respectively, and showed significant difference by Gentamycin ($p<0.05$). The minimum inhibitory concentration of *H. impelxa* sponge organic extract in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* was observed at 1 and 3 mg/ml concentration, respectively. Minimum bactericidal concentration observed in *Escherichia coli* at 3 mg/ml concentration and no effect on *Pseudomonas aeruginosa* strain observed.

Conclusion: Based on the results, *H. impelxa* sea sponge extract has a good antibacterial effect on pathogenic bacteria of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. Therefore, the extract of this sponge can be further studied for use in food packaging.

Keywords: Marine Sponge, Minimum Inhibitory Concentration, Minimum Bactericidal Concentration, Antibiotic, *Haliclona implexa*

[*]**Corresponding author:** Ali Taheri, **Email**: taherienator@gmail.com
Address: Faculty of Marine Sciences, Chabahar Maritime University, Chabahar, Iran.

مجله طب دریا
دوره ۵، شماره ۳، پاییز ۱۴۰۲
صفحات: ۱۴۴-۱۳۶
10.30491/5.3.136

بررسی اثر ضدباکتریایی عصاره متانولی اسفنج دریایی *هالیکلونا ایمپلکسا* ساکن در دریای عمان علیه باکتری‌های بیماری‌زای غذایی *اشریشیاکلی* و *سودوموناس آئروژینوزا*

علی طاهری [۱*]، سارا کاظمی خاناپشتانی [۲]، روح الله زارع [۳]

[۱] *دانشیار فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، چابهار، ایران*
[۲] *دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، چابهار، ایران*
[۳] *استادیار زیست شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، چابهار، ایران*

دریافت مقاله: ۱۴۰۲/۰۲/۲۲ **پذیرش مقاله:** ۱۴۰۲/۰۶/۱۴

چکیده

زمینه و هدف: برای مبارزه با میکروارگانیسم‌های بیماری‌زای غذایی جستجوی ترکیبات ضد میکروبی جدید ضروری است. در این میان اسفنج‌های دریایی به دلیل متابولیت‌های ثانویه، منابع بالقوه عوامل ضدمیکروبی جدید می‌باشند. در این مطالعه اثر ضد باکتریایی عصاره آلی متانولی اسفنج دریایی *هالیکلونا ایمپلکسا* جمع‌آوری شده از چابهار بررسی شد.

روش‌ها: این مطالعه در دو غلظت ۳ و ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر روی دو سویه باکتریایی از عوامل بیماری‌زای غذایی شامل *اشریشیاکلی* و *سودوموناس آئروژینوزا* توسط آزمون حساسیت به انتشار دیسک و حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) انجام شد. تجزیه آماری با آنالیز واریانس یک‌طرفه و مقایسه میانگین‌ها با پس‌آزمون توکی انجام شد.

یافته‌ها: بر اساس نتایج به‌دست‌آمده بیشترین تأثیر در غلظت ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر با قطر هاله عدم رشد (۱۱/۰۳۳±۱/۷) و (۱۲/۰۳۳±۰/۷۰۲) میلی‌متر به ترتیب برای باکتری *اشریشیاکلی* و *سودوموناس آئروژینوزا* به دست آمد که با جنتامایسین اختلاف داشت ($p<0/05$). حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره اسفنج *هالیکلونا ایمپلکسا* در باکتری *اشریشیاکلی* در ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر مشاهده شد و در باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* در غلظت ۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود. حداقل غلظت کشندگی در باکتری *اشریشیاکلی* در غلظت ۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر مشاهده شد و در سویه *سودوموناس آئروژینوزا* مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج می‌توان گفت که عصاره اسفنج دریایی *هالیکلونا ایمپلکسا* دارای اثر ضدباکتریایی علیه سویه‌های بیماری‌زای *اشریشیاکلی* و *سودوموناس آئروژینوزا* می‌باشد. از این‌رو، عصاره این اسفنج می‌تواند جهت استفاده در بسته‌بندی مواد غذایی مورد مطالعه تکمیلی قرار گیرد.

کلیدواژه‌ها: اسفنج دریایی، حداقل غلظت مهارکنندگی، حداقل غلظت کشندگی، ضدمیکروبی، *هالیکلونا ایمپلکسا*

*نویسنده مسئول: **علی طاهری**. پست الکترونیک: taherienator@gmail.com
آدرس: دانشیار فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، چابهار، ایران.

مقدمه

امروزه مقاومت باکتری‌های بیماری‌زا به آنتی‌بیوتیک‌های موجود رو به ازدیاد است و انسان را مجبور به جستجوی آنتی‌بیوتیک‌های جدید کرده است. از این رو تحقیقات برای دستیابی به منابع جدید طبیعی که خواص ضدمیکروبی قابل توجه داشته باشند مورد توجه است (۱). در سال‌های اخیر استفاده از ترکیبات طبیعی نقش پررنگی در مطالعات ضدمیکروبی داشته که در این بین نقش ترکیبات طبیعی با منشأ دریایی حائز اهمیت است. با توجه به قدمت طولانی حیات در دریاها و اقیانوس‌ها وجود ترکیبات پیچیده با اتم‌های هیدروژن سبب شکل‌گیری ساختارهایی خاص می‌شود که آن‌ها را از سایر ترکیبات متمایز می‌کند (۲).

اسفنج‌ها به‌عنوان منبع غنی از ترکیبات زیست فعال شناخته شده‌اند و آنها را به‌عنوان منابع بالقوه عوامل ضد میکروبی جدید می‌شناسند (۳). اسفنج‌ها با قدمت ۷۰۰–۸۰۰ میلیون سال از شاخه پوریفرا، پراکنش وسیعی از مناطق جزر و مدی تا هزاران متر از اعماق اقیانوس دارند (۴). اسفنج‌ها توانایی تولید ترکیباتی را دارند که از نظر ساختاری نسبت به ترکیبات شیمیایی شناخته شده محیط خشکی‌زی متفاوت هستند (۵). اسفنج‌های دریایی منبع غنی از متابولیت‌های ثانویه هستند که فعالیت‌های زیستی گسترده ای مثل مهار فعالیت آنزیمی، مهار تقسیم سلولی، فعالیت ضدویروسی، ضدمیکروبی، ضد التهاب، ضدتومور، سمیت سلولی و بهبود بیماری‌های قلبی و عروقی از خود نشان می‌دهند (۶).

گونه‌های مختلف اسفنج با توجه به موقعیت زیستی، متابولیت‌های ثانویه خاصی تولید می‌کنند. اغلب زیستگاه‌های اسفنج‌های دریایی دارای توده و باقیمانده غذایی بالا هستند و بستر مناسبی به جهت رشد میکروارگانیسم‌ها فراهم می‌کنند (۷). به این ترتیب میکروب‌ها یکی از تهدیدکنندگان مهم در بقاء اسفنج‌ها به شمار می‌روند. از این‌رو، اسفنج‌ها ترکیباتی با ویژگی‌های ضد باکتریایی تولید می‌کنند (۸). تاکنون حدود ۳۰ هزار ترکیب طبیعی از جانداران دریایی استخراج و شناسایی شده‌اند که بر طبق مطالعات انجام شده، تعداد مشخصی دارو در مراحل آزمایشی قرار دارند (۹). حدود ۳۰ درصد از ترکیبات شناسایی شده محیط دریایی مربوط به متابولیت‌های ثانویه اسفنج‌ها می‌باشد (۱۰). بسیاری از ترکیبات که دارای خاصیت دارویی می‌باشند از اسفنج‌ها و موجودات همزیست آنها جداسازی شده‌اند (۱۱). همچنین مطالعه Thakur و Müller (۱۲) نشان داده که در دهه‌های اخیر از ۵۰۰ گونه اسفنج که مورد بررسی قرار گرفته‌اند تعداد بسیار زیادی محصول با خواص بیولوژیک جداسازی و شناسایی شده‌اند.

گزارش شده است باکتری‌هایی مانند *سودوموناس آئروژینوزا* و *اشریشیاکلی* که در فرآورده‌های گوشتی مانند گوشت آبزیان یافت می‌شود می‌تواند عامل بیماری‌های غذایی باشد (۱۳،۱۴). *سودوموناس آئروژینوزا* یک باکتری گرم منفی با خصوصیت مقاومت ذاتی به انواع آنتی بیوتیک‌های معمول است. بر این اساس یافتن ترکیبات جدید در مبارزه با این باکتری ضروری به نظر می‌رسد (۱۵). همچنین، یکی از عوامل مهم در بیماری‌های غذازاد باکتری *اشریشیاکلی* است که مقاومت آنتی‌بیوتیکی بالایی دارد و باید با ترکیبات نوین ضدباکتری مورد مواجهه و درمان قرار گیرد (۱۶).

مطالعات متعددی فعالیت ضد باکتریایی عصاره‌های آلی اسفنج‌های دریایی در جهان را گزارش کرده اند. برای مثال مطالعه توسط Khakshoor و همکاران (۱۷) بر روی فعالیت ضدباکتریایی و ضدقارچی بر روی گونه *Gelliodes carnosa* با استفاده از حلال‌های مختلف متانولی، استونی، اتیل‌استات، اتانول، کلروفرم از طریق انتشار دیسک نشان داد که رشد باکتری‌ها تا ۷۰ درصد مهار شدند. همچنین می‌توان به مطالعه اثر ضد میکروبی عصاره‌های اسفنج در مطالعات Rifai و همکاران (۱۸) روی ده گونه اسفنج، Touati و همکاران (۱۹) روی ۷ گونه اسفنج، Galeano و همکاران (۲۰) روی ۲۴ گونه اسفنج و Safaeian و همکاران (۲۱) روی ۶ گونه اسفنج دریایی اشاره نمود.

در رده Demospongiae چندین اسفنج از راسته Haplosclerida به عنوان منابع غنی از تولیدات زیست فعال دریایی شناخته می شوند. در این بین جنس Haliclona (خانواده Chalinidae) به دلیل گسترش و تنوع گونه ای بالا و گستردگی متابولیت های تولیدی بیشتر مورد توجه قرار گرفته اند (۲۲). جنس هالیکلونا دارای بیش از ۶۰۰ گونه است که در سرتاسر جهان پراکنده است. اگر چه تعداد کمی از آنها که از اقیانوس آرام، اقیانوس هند، اقیانوس اطلس و دریای مدیترانه جمع آوری شده از نظر ترکیبات شیمیایی شناخته شده اند (۲۳،۲۴).

مطالعات شیمیایی متعددی روی اسفنج های دریایی جنس Haliclona انجام شده است و متابولیت های ثانویه متعددی شامل پلی استیلن‌ها، استروئیدها، آلکالوئیدها، پلی‌کتیدها، ماکرولیدها، پپتیدها و مشتقات هالوژنه جداسازی و شناسایی شده است (۲۵،۲۶).

در سواحل چابهار و دریای عمان نیز اسفنج های دریایی متعددی یافت می شود که یکی از این اسفنج ها گونه *Haliclona implexa* می‌باشد. *Haliclona implexa* اسفنجی منشعب با حداکثر اندازه ۱۰ سانتی متر و حداکثر قطر شاخه یک سانتیمتر است. اسفنجی به رنگ کرمی تا زرد تیره، بدنی نرم و تا حدی شکننده با پراکنش محدود می‌باشد (۲۷).

با توجه به توضیحات فوق و تنوع قابل ملاحظه اسفنج‌های دریایی در آب‌های دریای عمان، انجام مطالعات ضدباکتریایی درباره عصاره اسفنج‌های موجود در این منطقه از ضروریت‌های تحقیقاتی عصر حاضر به‌شمار می‌رود. هدف از انجام این پژوهش بررسی اثر ضدباکتریایی عصاره آلی اسفنج دریایی *Haliclona implexa* بر باکتری‌های بیماری‌زای غذازاد شامل *اشریشیاکلی* و *سودوموناس آئروژینوزا* و تعیین حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد

(Minimum Inhibitory Concentration: MIC) و حداقل غلظت کشندگی (Minimum Bactericidal Concentration: MBC) بود.

روش‌ها

جمع آوری و عصاره گیری اسفنج

گونه مورد مطالعه در این تحقیق اسفنج *Haliclona implexa* (شکل ۱) می‌باشد که به روش دستی از مناطق بین جزر و مدی در ساحل دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار جمع‌آوری و بلافاصله به آزمایشگاه منتقل شد. در آزمایشگاه فرآیند شستشو با آب شیرین انجام گرفت. اسفنج پاک‌سازی و تا زمان شروع آزمایش در دمای ۲۰ °C- فریز شد (۲۸). عصاره گیری با حلال متانول به نسبت یک به یک انجام شد. اسفنج‌ها ابتدا به قطعات کوچک‌تر برش داده و به مدت ۲۴ ساعت در شیکر انکوباتور در دمای اتاق در حلال مخلوط شدند. سپس با استفاده از کاغذ واتمن شماره یک صاف گردید. عصاره زیر هود حلال پرانی شد و درون ویال اپندورف ریخته شد و تا زمان آزمایش در فریزر نگه‌داری شد (۲۸).

شکل-۱. تصویر گونه اسفنج *Haliclona implexa* دریای عمان (تصویر از نگارندگان)

آزمون انتشار دیسک

سویه‌های باکتری‌های *Escherichia coli* و *Pseudomonas aeruginosa* از مرکز کلکسیون قارچ و باکتری کشور تهیه شد. اثرات ضد باکتری عصاره اسفنج تهیه شده بر باکتری *E. coli* (PTCC1399) و *P. aeruginosa* (PTCC 1430) بررسی شد. ابتدا باکتری‌ها در محیط کشت غیر اختصاصی نوترینت براث حاوی پپتون، عصاره گوشت و کلرید سدیم (Merck, Germany) کشت داده شد. پس از رسیدن به غلظت ۰/۵ مک فارلند با سواپ استریل در پلیت‌های حاوی محیط کشت نوترینت آگار کشت داده شد. سپس دیسک‌های بلانک با پنس استریل در پلیت قرار داده شد. پس از آن عصاره اسفنج متانولی با غلظت‌های ۳ و ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به میزان ۲۰ میکرولیتر با استفاده از سمپلر استریل به دیسک‌ها افزوده شد. جهت مقایسه نتایج آزمون از دیسک آنتی‌بیوتیک جنتامایسین (پادتن طب) به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. دیسک‌های آغشته به متانول به‌عنوان شاهد به کار رفت. سپس پلیت‌ها به انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انتقال داده شد و پس از ۲۴ ساعت هاله‌های عدم رشد باکتری با کولیس ورنیه اندازه‌گیری و گزارش شد (۲۹). آزمایش در سه تکرار انجام شد.

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

ابتدا هرکدام از سویه‌ها کشت شدند و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از رشد، باکتری‌ها از انکوباتور خارج شد و با استفاده از آنس از کلونی‌های ایجادشده به لوله‌های آزمایش حاوی محیط کشت براث اضافه شده و در انکوباتور قرار گرفت تا به کدورت ۰/۵ مک فارلند برسد. سپس ۶ لوله آزمایش که هر کدام حاوی دو میلی‌لیتر محیط کشت نوترینت براث استریل بود آماده شد. عصاره متانولی اسفنج در لوله آزمایش اول حاوی نوترینت براث اضافه گردید تا غلظت ۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بدست آید و سپس یک میلی‌لیتر از آن برداشته و به لوله دوم اضافه شد تا غلظت یک میلی‌گرم در میلی لیتر بدست آید و به صورت رقت متوالی تا لوله ششم کشت داده شد. به هر لوله ۵۰ میکرولیتر محلول باکتری با غلظت $1/5 \times 10^{8}$ CFU/ml اضافه شد. برای شاهد شش لوله آزمایش با محیط کشت براث استریل و عصاره اضافه شد و به همین ترتیب رقیق شد و برای کنترل مثبت محیط کشت براث با باکتری قرار داده شد. در پایان در لوله‌های آزمایش را با پنبه استریل پوشانده و در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. آزمایش با سه تکرار انجام شد. بعد از گذشت ۲۴ ساعت لوله‌های آزمایش از انکوباتور خارج شده و کدورت آن‌ها به‌صورت چشمی با قرار گرفتن در فاصله ۲۰ سانتی متری از چشم و حضور منبع نور کافی مورد بررسی قرار گرفتند و هر کدام از لوله‌ها با شاهد خود مقایسه شد. لوله‌هایی که کدورت داشتند از ادامه کار خارج شد و لوله‌هایی که در آن‌ها کدورت ایجاد نشده بود برای ادامه کار جدا شد. غلظت اولین لوله آزمایش بدون کدورت ممانعت از رشد باکتری را نشان می‌دهد و به عنوان MIC شناخته شد. در ادامه آزمایش به‌منظور تعیین حداقل غلظت عصاره مورد نظر در از بین بردن باکتری (MBC) از لوله‌های آزمایش مورد نظر که کدورت نداشت به میزان ۱۰۰ میکرولیتر با سمپلر استریل برداشته و به صورت پورپلیت کشت داده شد. پلیت‌ها در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار داده و پس از ۲۴ ساعت برای بررسی تعداد کلنی تشکیل شده خارج گردید (۳۰). آزمایش ها در سه تکرار انجام شد.

تجزیه و تحلیل داده ها

نتایج هاله عدم رشد به صورت انحراف معیار ± میانگن گزارش شد. از آزمون شاپیرو-ویلک جهت بررسی نرمال بودن داده‌های هاله عدم رشد استفاده شد. از آنالیز واریانس یک‌طرفه (One

Way ANOVA) جهت بررسی اختلافات معنی‌دار و پس‌آزمون توکی با استفاده از نرم‌افزار Graphpad-Prism (نسخه ۷) جهت مقایسه میانگین‌ها در سطح اطمینان ۹۵ درصد استفاده شد.

نتایج

نتایج مربوط به آزمون حساسیت به روش انتشار دیسک عصاره متانولی اسفنج *H. implexa* بر روی سویه‌های باکتری *E. coli* و *P. aeruginosa* و آنتی بیوتیک جنتامایسین در جدول ۱ ارائه شده است.

بر اساس نتایج به دست آمده باکتری *P. aeruginosa* بیشترین حساسیت را نسبت به عصاره متانولی اسفنج *H. implexa* در غلظت ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر با میانگین و قطر هاله عدم رشد (۱۲/۰۳۳±۰/۷۰۲) میلی‌متر از خود نشان داد که در مقایسه با نتایج آنتی‌بیوتیک، عصاره اسفنج از تأثیر خوبی برخوردار است. تأثیر عصاره آلی اسفنج *H. implexa* بر روی باکتری *E. coli* نیز در غلظت ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بیشترین اثر با قطر هاله عدم رشد (۱۱/۳۳±۱/۷) میلی‌متر را نشان داد. در هر دو باکتری با افزایش غلظت عصاره، اثر آن بر روی باکتری و قطر هاله‌ها عدم رشد بیشتر شد. اما اندازه هاله ایجاد شده در هر دو غلظت کمتر از اثر جنتامایسین (کنترل مثبت) است.

جدول-۱. اندازه قطر هاله‌های عدم رشد عصاره اسفنج *H. implexa* به میلی‌متر

	غلظت۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر	غلظت ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر	جنتامایسین
P. aeruginosa	۱۰/۰±۴/۸۸ c	۱۲/۰۳±۰/۷ b	۱۵/۰±۰/۶ a
E. coli	۱۱/۵۲±۲ b	۱۱/۰۳±۱/۷ b	۱۷/۹۵±۰ a

حروف متفاوت در هر ردیف نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح اطمینان ۰/۰۵ می‌باشد.

نتایج آزمون حساسیت غلظت‌های مختلف عصاره بر روی باکتری‌ها در جدول ۲ نشان می‌دهد که با افزایش غلظت عصاره کدورت نیز کم می‌شود و در غلظت ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در باکتری *E. coli* لوله فاقد کدورت بود و حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) را نشان داد. در باکتری *P. aeruginosa* تنها در غلظت ۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر فاقد کدورت بود که دارای حداقل غلظت مهارکنندگی است.

جدول-۲. نتایج حداقل غلظت ممانعت‌کننده از رشد (MIC) عصاره اسفنج *H. implexa* بر دوسویه باکتریایی مورد مطالعه

	غلظت (mg/ml)				
سویه باکتری	۳	۱	۰/۳۳	۰/۱۱	۰/۰۳۶
E. coli	+	+	–	–	–
P. aeruginosa	+	–	–	–	–

نتایج به دست آمده در جدول ۳ عصاره آلی اسفنج *H. implexa* بر روی دوسویه باکتری *E. coli* و *P. aeruginosa* نشان می‌دهد حداقل غلظت کشندگی در باکتری *E. coli* در غلظت ۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر مشاهده شد و در باکتری *P. aeruginosa* حداقل غلظت کشندگی مشاهده نشد.

جدول-۳. نتایج حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره اسفنج *H. implexa* بر دوسویه باکتریایی مورد مطالعه

	غلظت (mg/ml)	
سویه باکتری	۳	۱
E. coli	+	–
P. aeruginosa	–	–

بحث

هدف از این پژوهش بررسی اثر ضدباکتری عصاره آلی اسفنج *H. implexa* علیه دو باکتری *E. coli* و *P. aeruginosa* بود که بر اساس نتایج عصاره مورد نظر اثر ضدباکتریایی قابل توجهی نشان داد. بر اساس نتایج به دست آمده بیشترین تأثیر در غلظت ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر با قطر هاله‌های عدم رشد بر دوسویه باکتری به میزان (۱۱/۰۳±۱/۷) و (۱۲/۰۳±۰/۷۰) میلی‌متر به دست آمد. حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره آلی اسفنج *H. implexa* در باکتری *E. coli* در غلظت ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر مشاهده شد و در باکتری *P. aeruginosa* در غلظت ۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود. حداقل غلظت کشندگی در باکتری *E. coli* در غلظت ۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر مشاهده شد و در سویه *P. aeruginosa* حداقل غلظت کشندگی مشاهده نشد.

تاکنون بیش از ۸۰۰ مورد آنتی بیوتیک از اسفنج های دریایی جداسازی شده است (۱۹). بنابراین شاخه پوریفرا رنج گسترده ای از ترکیبات زیست‌فعال را تولید می کند (۳۱،۳۲). بر اساس مطالعات گذشته اسفنج‌های دریایی غنی ازترکیبات با فعالیت‌های زیستی متفاوت مانند استروئیدها، آلکالوئیدها، پپتیدهای زیست فعال و اسیدهای چرب اشباع نشده هستند (۳۳).

مطالعات متعددی اثر ضد باکتریایی عصاره‌های آلی اسفنج‌های دریایی را گزارش نموده اند. Rifai و همکاران (۱۸) با بررسی خواص ضدمیکروبی و ضدقارچی۱۰ گونه اسفنج جمع‌آوری شده از سواحل اقیانوس اطلس اثر عصاره اسفنج‌های *H. communis* و *I. variabilis* و *T. japonica* بر روی باکتری *E. coli* را با قطر هاله عدم رشد ۱۳، ۱۴ و ۱۱ میلی‌متر گزارش کردند که نشان دهنده اثر متوسط عصاره‌ها روی این سویه باکتری بود. هم‌چنین

در این تحقیق ۵۰٪ اسفنج‌ها حداقل در مقابل یک سویه آزمایش فعالیت ضدمیکروبی از خود نشان دادند. Touati و همکاران (۱۹) در بررسی فعالیت ضدمیکروبی و ضدقارچی روی ۷ گونه اسفنج جمع‌آوری شده سواحل دریای مدیترانه در تونس بر روی ۸ سویه باکتری بیماری‌زا *Staphylococcus epidermidis*، *Staphylococcus aureus*، *Micrococcus luteus* و *Enterococcus feacalis* (گرم مثبت) و *Escherichia coli*، *Pseudomonas aeruginosa*، *Salmonella thyphymerium* و *Listeria monocytogenes* (گرم منفی) مشخص نمودند که ۹۰٪ عصاره‌های اسفنجی حداقل نسبت به یک‌سویه باکتری اثر ضد باکتریایی نشان دادند و قطر هاله عدم رشد اسفنج‌های *A. oroides*، *A. damicornis* و *I. sarcotragus* علیه باکتری *E. coli* برابر با ۱۳، ۲۰ و ۷ میلی‌متر و علیه باکتری *P. aeruginosa* به ترتیب برابر با ۸، ۱۲و ۸ میلی‌متر گزارش شد. این محققین اعلام نمودند که عصاره‌های اسفنجی *Agelas oroides* و *Axinella damicornis* به دلیل توانایی آن‌ها برای مهار رشد *Listeria monocytogenes*، *Enterococcus feacalis* و *Pseudomonas aeruginosa* و هم‌چنین فعالیت وسیع طیفی علیه همه باکتری‌های دیگر، به‌عنوان یک منبع بالقوه ترکیبات فعال بیولوژیکی مواد ضدمیکروبی، ضدقارچی هستند. Galeano و همکاران (۲۰) با غربالگری ۲۴ گونه اسفنج از منطقه کارائیب و بررسی بر روی دو گونه شناخته شده باکتری *E. coli* و *Staphylococcus aureus* با استفاده از حلال‌های متانول، کلروفرم و ان-هگزانی نشان دادند که قطر هاله عدم رشد باکتری *E. coli* با بیشترین مقدار ۱۴ میلی‌متر در اسفنج *Topsentia ophiraphidites* در حلال متانولی مشاهده شد و ۸۰٪ عصاره اسفنج فعالیتی نسبت به یک‌سویه باکتری نشان داد و سه گونه‌ای که بیشترین فعالیت با طیف وسیعی از هاله‌های ضدمیکروبی داشتند عبارت‌اند از *Cinachyrella kuekenthali*، *Leucetta aff. Floridana*، *Svensea zeai*. Safaeian و همکاران (۲۱) در بررسی اثر ۶ گونه اسفنج جمع‌آوری شده از خلیج نایبند استان بوشهر در مقابل باکتری‌های *E. coli* و *P. aeruginosa* با استفاده از حلال‌های قطبی متانول، اتیل‌استات و هگزان گزارش نمودند ۸۳/۳ ٪ عصاره اسفنج فعالیتی را علیه یک‌سویه باکتری نشان داد. هم‌چنین حداقل غلظت مهار (MIC) عصاره‌ها با فعالیت مطلوب (مهار بیش از ۹ میلی‌متر) را گزارش کردند. بیشترین هاله عدم رشد نسبت به باکتری *P. aeruginosa* در حلال متانولی در دو اسفنج *Spheciospongia spp.* و *Spheciospongia inconstans* برابر با ۸/۴ میلی‌متر بود و هاله عدم رشد نسبت به باکتری *E. coli* در حلال متانولی بیشترین مقدار برابر ۱۱ میلی‌متر در اسفنج *Spheciospongia spp.* گزارش شد و MIC آن ۲۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بیان شد. Govinden و همکاران (۳۴) با بررسی خصوصیات ضد باکتریایی اسفنج‌های دریایی و با استفاده از حلال ترکیبی متانول و دی‌کلرومتان (۱:۱) به این نتیجه رسیدند که عصاره خام اسفنج دریایی *Biemna tubulosa* و Styllissa spp بیشترین میزان MIC را در محدوده غلظت ۰۹/- mg/ml ۵-۲/۵۵ نشان دادند که احتمالاً به این دلیل است که عصاره حاوی مخلوطی از ترکیبات فعال و غیرفعال است و بنابراین MIC بالاتر به دست می‌آید. این پژوهش فرضیه غنای شیمیایی اسفنج‌ها را تائید می‌کند و بیان می‌دارد که طیف گسترده‌ای از فعالیت ضدمیکروبی این اسفنج‌ها احتمالاً به دلیل حضور سس‌ترپن‌ها، تری‌ترپن‌ها، آلکالوئیدها و تانن‌های شناسایی شده در عصاره است. Nazemi و همکاران (۳۵) در بررسی اسفنج *Niphates furcate* از جزیره فارور خلیج‌فارس نشان دادند که عصاره متانولی اسفنج مانع از رشد باکتری در غلظت ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بر روی باکتری *Bacillus subtilis* و در غلظت ۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بر روی باکتری *Staphylococcus aureus* و *Bacillus cereus* می‌شود. MIC عصاره متانولی اسفنج بر روی دو باکتری *E. coli* و *P. aeruginosa* به ترتیب برابر ۳ و ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و MBC باکتری *E. coli* برابر ۳۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و باکتری *P. aeruginosa* فاقد MBC است. در مطالعه حاضر هاله عدم رشد عصاره اسفنج دریایی *H. implexa* در بهترین حالت بیش از ۱۰ میلی‌متر بود که برخی از مواردی که در فوق بحث گردید و هاله عدم رشد ۸ میلی‌متر داشتند بهتر بود و می‌تواند به عنوان یک ترکیب ضد باکتریایی مورد توجه قرار گیرد. از سوی دیگر حداقل غلظت مهار کنندگی عصاره اسفنج مذکور کمتر از بسیاری موارد گزارش شده است و همچنین میزان حداقل غلظت کشندگی برای باکتری *اشریشیاکلی* نیز در غلظت ۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به‌دست آمد که با نتایج مطالعه Nazemi و همکاران (۳۵) مشابه بود. میزان MBC در تحقیق حاضر در غلظت کمتری نسبت به تحقیق Nazemi و همکاران (۳۵) بود که نشان از اثر بیشتر عصاره متانولی اسفنج تحقیق حاضر داشت.

البته تحقیقات متعددی نیز وجود دارد که عصاره آلی اسفنج ها را علیه باکتری‌های مختلف گرم مثبت و گرم منفی بی‌اثر گزارش نموده است. برای مثال در مطالعه روی عصاره‌های متانولی اسفنج-های *Haliclona mediterranea*، *Cinachyrella tarentine*، *Ircinia oros*، *Haplosclerida adocia* و *Axinella polypoides* جهت مهار باکتری *باسیلوس سابتیلیس* هیچ اثر ضد باکتری گزارش نشد (۸). در مطالعه‌ای دیگر عصاره اتیل‌استاتی اسفنج‌های *Agelas oroides*، *Axinella damicornis*، *Petrosia ficiformis* و *Ircinia spinosula* فعالیت ضدباکتریایی و هاله عدم‌رشد نشان دادند اما عصاره‌های اسفنج‌های *Hippospongia communis* و *Ircinia sarcotragus* اثر ضدباکتری علیه باکتری های گرم منفی ایجاد نکردند (۱۹). در مطالعه کریم پور و همکاران (۳۶) اثر ضدباکتریایی عصاره آلی اسفنج *هالیکلونا کارلا* را در منطقه جزر و

مدی جزیره لارک واقع در خلیج فارس بررسی کردند. در این مطالعه عصاره اسفنج در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اثر مهار رشد علیه *اشریشیاکلی* نشان داد ولی اثر باکتری‌کشی نداشت. همچنین عصاره‌های این مطالعه اثر ضدباکتریایی علیه *سودوموناس آئروژینوزا* نشان نداد. در مطالعه Darah و همکاران (۳۷) عصاره متانولی اسفنج جنس هالیکلونا علیه باکتری *اشریشیاکلی* اثر ضدباکتریایی نداشت. عصاره‌های آلی اسفنج *Iophon laevistylus* جزیره فارور خلیج فارس نیز علیه *سودوموناس آئروژینوزا* خاصیت ضدباکتری نداشت (۳۸). در مطالعه Angulo-Preckler و همکاران (۳۹) عصاره‌های آلی اسفنج‌های *Haliclona penicilata*، Haliclona sp1 و Haliclona sp2 اثر ضدباکتریایی علیه *اشریشیاکلی* و *سودوموناس آئروژینوزا* نداشتند و فقط *باسیلوس سابتیلیس* را مهار نمودند.

تغییرات مشاهده شده می‌تواند به دلیل تغییرات فصلی متابولیت‌ها در اسفنج باشد. بر اساس مطالعه Reverter و همکاران (۴۰) روی متابولومیکس *Haliclona fulva* و *Haliclona mucosa* تغییرات گسترده‌ای در متابولیت‌های شناسایی شده با تغییر فصل گزارش شد که شیمیوتاکسونومی این اسفنج‌ها را دچار مشکل می‌نمود. لذا ممکن است یک متابولیت با فعالیت ضدباکتریایی در یک زمان از سال در حداکثر تولید و فعالیت باشد و در زمانی دیگر از سال در حداقل میزان باشد و یا اثر نشان دهند یا در غلظت های بالاتر اثر ضد باکتری نشان دهد که میزان MIC و MBC متفاوتی در هر اسفنج و در هر زمان از سال مشاهده خواهد شد.

شناسایی و خالص‌سازی ترکیبات زیست فعال آخرین مرحله در تحقیقات متابولیت های جدید دریایی است. در این راستا شناسایی و خالص‌سازی ترکیبات شیمیایی با خواص ضدباکتری از اسفنج‌های متعددی انجام شده است. برای مثال از یک جنس Haliclona لیپیدهای حاوی استیلن با فعالیت ضدباکتریایی جداسازی شده است (۲۴). آنالوگ‌های برومو‌تیروزین از اسفنج *Suberea ianthelliformis* با فعالیت ضدباکتریایی علیه سودوموناس آئروژینوزا جداسازی شده است (۴۱). کلاتریک اسید که یک مشتق ترپنی بی‌سیکلیک است از عصاره اسفنج *Clathria compressa* گزارش شده است (۳۳). دی فنیل اتر پلی برمیناتد از عصاره متانولی اسفنج *Dysidea gruanulosa* جداسازی شده که علیه باکتری‌های غذازاد و پاتوژن‌های انسانی فعالیت ضدباکتریایی قوی نشان داده است (۴۲). بر اساس گزارش‌ها اسفنج‌های دریایی منبع خوب و جدیدی از ترکیبات فورانوترپن‌ها A و B، هیپوسولفات A و متاکرومین A و B و E هستند که می‌تواند اثرات ضد-باکتریایی داشته باشد (۱۸). لذا باید تاکید نمود که نتایج حاصل از تحقیق حاضر می‌تواند آغاز راه متابولومیکس و خالص‌سازی ترکیبات فعال ضد باکتریایی اسفنج *H. implexa* ساکن در دریای عمان باشد.

نتیجه‌گیری

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که عصاره آلی اسفنج گونه *Haliclona implexa* اثر ضدباکتریایی علیه باکتری‌های *اشریشیاکلی* و *سودوموناس آئروژینوزا* نشان داده و تفاوت بین مطالعه حاضر و سایر تحقیقات گزارش شده می‌تواند به علت گونه‌های مختلف مورد بررسی و محیطزیست و تفاوت اکولوژیکی و فصل باشد. پیشنهاد می‌گردد مطالعه روی عصاره‌های حاضر علیه سایر سویه‌های باکتری بیماری‌های غذازاد در محیط آزمایشگاهی و در بسته‌بندی مواد غذایی مانند گوشت ماهی ادامه یابد و در صورت فراهم شدن امکانات به مطالعات متابولومیکس پرداخته شود.

تشکر و قدردانی: نویسندگان از دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار به جهت حمایت مادی و معنوی تحقیق حاضر و آقای مهندس یوسف اریش به دلیل کمک در انجام آزمایش تشکر و قدردانی می‌کنند.

نقش نویسندگان: طاهری (نویسنده اول و مسئول مکاتبات)، پژوهشگر اصلی/ نویسنده مقاله؛ کاظمی خاناپشتانی (نویسنده دوم)، جمع آوری داده/ پژوهشگر عملیاتی ؛ زارع (نویسنده سوم)، پژوهشگر کمکی/ بررسی مقاله و اصلاحات. همه نویسندگان در نگارش اولیه مقاله یا بازنگری آن سهیم بودند و همه با تایید نهایی مقاله حاضر، مسئولیت دقت و صحت مطالب مندرج در آن را می پذیرند.

تضاد منافع: نویسندگان تصریح می کنند که هیچ گونه تضاد منافعی در مطالعه حاضر وجود ندارد.

منابع

1. Okeke, N.; Laxmaninarayan, R.; Bhutta, A. Antimicrobial resistance in developing countries, Part 1: recent trends and current status. LanInfedis; 2005; 5: 481-493 doi:10.1016/S1473-3099(05)70189-4
2. Mancini, I.; Defant, A.; Guella, G. Recent synthesis of marine natural products with antibacterial activities. Ant Infective Agent Medic Chem; 2007; 6(1): 17-48 doi:10.2174/187152107779314151
3. Nazim, K.; Sherwani, S.K.; Khan, M.U. Antibacterial Activity of Marine Sponge Collected from Sunhari Beach. Fuuast J Biol; 2014; 4(2): 6-33
4. Jimeno, J.; Lopez-Martin, J.; Ruiz-Casado, A.; Izquierdo, M.; Scheuer, P.; Rinehart, K. Progress

in the clinical development of new marine-derived anticancer compounds. Ant Cancer Drug; 2004; 15(4): 321-329 doi:10.1097/00001813-200404000-00003
5. Thomas, T.R.A.; Kavlekar, D.P.; LokaBharathi, P.A. Marine drugs from sponge-microbe association—A review. Mar Drug; 2010; 8(4):1417-1468. doi: 10.3390/md8041417
6. Schneemann, I.; Nagel, K.; Kajahn, I.; Labes, A.; Wiese, J.; Imhoff, J.F. Comprehensive investigation of marine Actinobacteria associated with the sponge *Halichondria panicea*. Appl Environ Microbiol; 2010; 76(11):3702-3714 doi: 10.1128/AEM.00780-10.
7. Mansurlakuraj, M.; Rezaei Tavabe, K.; Mirvaghefi, A.; Nazemi, M.; Nematollahi, M. Evaluation and Comparison of Effects of N-hexane and Acetone Extracts Derived from Marine Geyser (*Phaulasia nigra*), Marine Sponge (*Cliona* spp.), Carpet Anemone (*Sarcophyton* spp.) and Starfish (*Pentaceraster* spp.) on *E. coli* bacteria. J fisheries; 2017; 69(4): 462-470. doi: 10.22059/JFISHERIES.2017.63864
8. El-Amraoui, B.; Biard, J.F.; Uriz, M.; Rifai, S.; Fassouane, A. Antifungal and antibacterial activity of Porifera extracts from the Moroccan Atlantic coasts. J Med Mycol; 2010; 20(1): 70-74 doi: 10.1016/j.mycmed.2009.11.001
9. Lyu, C.; Chen, T.; Qiang, B.; Liu, N.; Wang, H.; Zhang, L.; Liu, Z. CMNPD: a comprehensive marine natural products database towards facilitating drug discovery from the ocean, Nucleic Acid Res., 2021; 49(1), 509–515 doi:10.1093/nar/gkaa763.
10. Calcabrini, C.; Catanzaro, E.; Bishayee, A.; Turrini, E.; Fimognari, C. Marine sponge natural products with anticancer potential: An updated review. Mar Drug; 2017; 15(10): 310 doi: 10.3390/md15100310.
11. Hochmuth, T.; Piel, J. Polyketide synthases of bacterial symbionts in sponges Evolution based applications in natural products research. Phytochem.; 2009; 70(15-16): 1841-1849 doi: 10.1016/j.phytochem.2009.04.010.
12. Thakur, N.L.; Müller, W.E. Biotechnological potential of marine sponges. Current Sci.; 2004; 1506-1512
13. Nakai, S.A.; Siebert, K.J. Organic acid inhibition models for *Listeria innocua*, *Listeria ivanovii*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Oenococcus oeni*. Food Microbiol.; 2004; 21:67–72 doi:10.1016/S0740-0020(03)00043-1
14. Rajkowski, K.T. Thermal inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and Salmonella on catfish and tilapia. Food Microbiol.; 2012; 30: 427-431. doi: 10.1016/j.fm.2011.12.019
15. Hancock, R.E.; Speert, D.P. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and impact on treatment. Drug Resist Updat.; 2000; 3(4): 247-255. doi: 10.1054/drup.2000.0152
16. Parham, S.; Wicaksono, D.H.B.; Bagherbaigi, S.; Lee, S.L.; Nur, H. Antimicrobial treatment of different metal oxide nanoparticles: a critical review. J Chin Chem Soc.; 2016; 63: 385-393. doi:10.1002/chin.201625225
17. Khakshoor, M.S.; Pazooki, J. Bactericidal and fungicidal activities of different crude extracts of *Gelliodes carnosa* (sponge, Persian Gulf). Iran J Fisheries Sci.; 2014; 13(3): 776-784
18. Rifai, S.; Fassouane, A.; El-Abbouyi, A.; Wardani, A.; Kijjoa, A.; Van Soest, R. Screening of antimicrobial activity of marine sponge extracts. J Med Mycol; 2005; 15(1): 33-38. doi:10.1016/j.mycmed.2004.11.001
19. Touati, I.; Chaieb, K.; Bakhrouf, A.; Gaddour, K. Screening of antimicrobial activity of marine sponge extracts collected from Tunisian coast. J Med Mycol; 2007; 17(3):183-187
20. Galeano, E.; Martínez, A. Antimicrobial activity of marine sponges from Urabá Gulf, Colombian Caribbean region. J Med Mycol; 2007; 17(1): 21-24. doi:10.1016/j.mycmed.2006.12.002
21. Safaeian, S.; Hosseini, H.; Abbas Pour, A.A.; Farmohamadi, S. Antimicrobial activity of marine sponge extracts of offshore zone from Nay Band Bay, Iran. J Med Mycol.; 2009; 19(1):11-16. doi: 10.1016/j.mycmed.2008.11.003
22. Tribalat, M.-A. 2016. Specialized metabolisms of Mediterranean sponges of genus *Haliclona Grant*, 1836. Nice: Université Côted'Azur. 69p.
23. Carneiro, R.F.; de Melo, A.A.; de Almeida, A.S.; Moura, R.D.; Chaves, R.P.; de Sousa, B.L.; Nagano, C.S. H-3, a new lectin from the marine sponge *Haliclona caerulea*: Purification and mass spectrometric characterization. Int J Biochem Cell Biol; 2013; 45: 2864–2873 doi: 10.1016/j.biocel.2013.10.005
24. Nuzzo, G.; Ciavatta, M.L.; Villani, G.; Manzo, E.; Zanfardino, A.; Varcamonti, M.; Gavagnin, M. Fulvynes, antimicrobial polyoxygenated acetylenes from the Mediterranean sponge *Haliclona fulva*. Tetrahedron; 2012; 68: 754–760.
25. Hoppers, A; Stoudenmire, J; Wu, S; Lopanik, N. Antibiotic activity and microbial community of the temperate sponge, *Haliclona*

sp. J Appl Microbiol; 2015;118(2): 419-30. doi:10.1111/jam.12709
26. Hameş-Kocabaş, E.E.; Ataç, U.Z.E.L. Isolation strategies of marine-derived actinomycetes from sponge and sediment samples. J Microbiol Method; 2012; 88(3): 342-349 doi:10.1016/j.mimet.2012.01.010
27. Weerdt, H.; van Soest, R. Marine shallow-water Haplosclerida (Porifera) from the south-eastern part of the North Atlantic Ocean. Zool Verh; 1986; 225(1):1-49
28. Khairunnisa, Kurnianda, V. Bioactivity from Indonesian's Marine Sponge *Xestospongia* Sp. as Antibacterial Resistance *Escherichia coli*. Nat Prod Chem Res; 2017; 5(265): 1-4
29. Jahan, N.; Khatoon, R.; Shahzad, A.; Shahid, M.; Ahmad, S. Comparison of antibacterial activity of parent plant of *Tylophora indica Merr*. with its in vitro raised plant and leaf callus. Afr J Biotechnol; 2013; 12(31): 4891-4896 doi:10.5897/AJB2013.12488
30. Shen, Y.C.; Chen, C.Y.; Kuo, Y.H. New Sesquiterpene Hydroquinones from a Taiwanese Marine Sponge, *Hippospongia metachromia*. J Nat Prod; 2001; 64(6): 801-803 doi: 10.1021/np000610c.
31. Blunt, J.W.; Copp, B.R.; Munro, M.H.G.; Northcote, P.T.; Prinsep, M.R. Marine natural products. Nat Prod Rep; 2016; 28:196–268 doi: 10.1039/c005001f.
32. Haber, M.; Ilan, M. Diversity and antibacterial activity of bacteria cultured from Mediterranean Axinella spp. sponges. J Appl Microbiol; 2014; 116(3): 519–532 doi: 10.1111/jam.12401.
33. Gupta, J.; Misra, S.; Mishra, S.K.; Srivastava, S.; Srivastava, M.N.; Lakshmi, V.; Misra-Bhattacharya, S. Antifilarial activity of marine sponge *Haliclona oculata* against experimental *Brugia malayi* infection. Exp Parasitol; 2012; 130(4): 449-455 doi: 10.1016/j.exppara.2012.01.009
34. Govinden-Soulange, J.; Marie, D.; Kauroo, S.; Beesoo, R.; Ramanjooloo, A. Antibacterial properties of marine sponges from Mauritius waters. Trop J Pharm Res; 2013; 13(2): 249-254 doi:10.4314/tjpr.v13i2.13
35. Nazemi, m.; Jahromi, S.; Salari, Z.; Gozari, M. Comparison of antibacterial activity in methanol extract of sea cucumber (*Holothuria leucospilota*) and sponge *Niphates furcata* from Hengam Island, Persian Gulf. J Mar Biol; 2017; 8(4):65-72.
36. Karimpoor, M.; Kamrani, E.; Yousefzadi, M.; Nazemi, M. Antibacterial and antioxidant potential of *Haliclona caerulea* Extracts from tidal island Larak, Persian Gulf. Modares J Biotechnol; 2018; 9(3): 347-353.
37. Darah, I.; Lim, C.L.; Nurul Aili, Z.; Nor–Afifah, S.; Shaida Fariza, S. Effects of methanolic extract of a soft sponge, Haliclona sp. on bacterial cells: Structural degeneration study. Int J Compr Pharm; 2011; 7(3):1-6.
38. Nazemi, M.; Khoshkhoo, Z.; Motalebi, A.A.; Karimi Firozjaee, H.; Pishevarzad, F. Identification nonpolar component and antibacterial activities of *Iophon laevistylus* from Persian Gulf. Int J Environ Sci Dev; 2010; 1(2):107-110.
39. Angulo-Preckler, C.; San Miguel, O.; García-Aljaro, C.; Avila, C. Antibacterial defenses and palatability of shallow-water Antarctic sponges. Hydrobiologia; 2018; 806: 123–138 doi:10.1007/s10750-017-3346-5
40. Reverter, M.; Tribalat, M.A.; Pérez, T.; Thomas, O.P. Metabolome variability for two Mediterranean sponge species of the genus Haliclona: specificity, time, and space. Metabolomics; 2018; 14(114): 1-12 doi: 10.1007/s11306-018-1401-5
41. Xu, M.; Davis, R.A.; Feng, Y.; Sykes, M.L.; Shelper, T.; Avery, W.M.; Camp, D.; Quinn, R.J. Ianthelliformisamines A–C, antibacterial bromotyrosine-derived metabolites from the marine sponge *Suberea ianthelliformis*. J Nat Prod; 2012; 75(5): 1001–1005 doi: 10.1021/np300147d
42. Sun, S.; Canning, C.B.; Bhargava, K.; Sun, X.; Zhu, W.; Zhou, N. Zhang, Y.; Zhou, K. Polybrominated diphenyl ethers with potent and broad-spectrum antimicrobial activity from the marine sponge Dysidea. Bioorg Med Chem Lett; 2015; 25(10): 2181–2183. doi: 10.1016/j.bmcl.2015.03.057