



Antibacterial and Antioxidant Potential of *Haliclona caerulea* Extracts from Tidal Island Larak, Persian Gulf

ARTICLE INFO

Article Type

Original Research

Authors

Karimpoor M.¹ MSc,
Kamrani E.^{*2} PhD,
Yousefzadi M.¹ PhD,
Nazemi M.³ PhD

How to cite this article

Karimpoor M, Kamrani E, Yousefzadi M, Nazemi M. Antibacterial and Antioxidant Potential of *Haliclona caerulea* Extracts from Tidal Island Larak, Persian Gulf. Modares Journal of Biotechnology. 2018 ;9(3):347-353.

¹Marine Biology Department, Marine Science & Technology Faculty, Hormozgan University, Bandar Abbas, Iran

²Fisheries Department, Marine Science & Technology Faculty, Hormozgan University, Bandar Abbas, Iran

³Persian Gulf & Oman Sea Ecological Center, Bandar Abbas, Iran

*Correspondence

Address: Hormozgan University, 9 Kilometer Minab Road, Bandar Abbas, Iran. Postal Code: 7916193145
Phone: +98 (76) 33711025
Fax: +98 (76) 33711025
ezas47@gmail.com

Article History

Received: September 16, 2016

Accepted: August 20, 2017

ePublished: September 22, 2018

ABSTRACT

Aims Considering the importance of health and some disadvantages of the existing synthetic compounds, the present research aimed at evaluating the antibacterial and antioxidant potential of *Haliclona caerulea* extracts.

Materials & Methods In the present experimental study, organic extracts of n-hexane, diethyl ether, and methanol were prepared by the Bligh and Dyer method from the marine sponge; then, antibacterial activity was measured by disc diffusion, minimum inhibitory concentration (MIC), and minimum bactericidal concentration (MBC), and antioxidant activity was measured by evaluating the regenerative power and determining the total antioxidant capacity of the extracts. The data were analyzed by Duncan's new multiple range test (MRT) one-way ANOVA test. SPSS 19 and Excel 2013 software were used.

Findings Methanol extract had the most antibacterial effect, especially against Gram positive bacterial of *Bacillus subtilis* with a concentration of 2.5mg/ml and *Staphylococcus aureus* with a concentration of 5mg/ml. Diethyl ether extracts showed the highest antioxidant activity at concentration of 5mg/ml.

Conclusion The methanol extract of *Haliclona caerulea* exhibits more antibacterial properties, and the diethyl ether extract of this sponge have a higher antioxidant effect.

Keywords Antibacterial; Antioxidant; Persian Gulf; Marine Sponges; Minimum Inhibitory Concentration

CITATION LINKS

[1] Marine biodiversity as a source of chemical ... [2] Bioactive compounds from marine invertebrates for ... [3] Marine natural product drug discovery ... [4] Evaluation of single and joint effect of metabolites isolated from marine sponges ... [5] Marine natural ... [6] Merging the potential of microbial genetics with biological and chemical diversity: An even brighter future for ... [7] Antifungal and antibacterial activities of four Malaysian sponge ... [8] Antifilarial activity of marine sponge *Haliclona oculata* against experimental ... [9] Free-radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushrooms from northeast Portugal: Individual ... [10] Antioxidant activity of a flavonoid-rich extract of *Hypericum* ... [11] Evaluation of antioxidant property of extract and fractions obtained from a red ... [12] Antioxidant capacities and total phenolic contents of 62 ... [13] Antioxidant and free radical scavenging activities of wild bitter ... [14] Antimicrobial and antioxidant activity of purple Sea urchin shell ... [15] Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical ... [16] Optimisation of hydrolysis of purple sea urchin (*Strongylocentrotus nudus*) gonad by response surface methodology and evaluation of in vitro antioxidant activity of the ... [17] Identification nonpolar component and antibacterial activities of Iophon ... [18] Evaluation of antibacterial, antifungal and cytotoxic effects of *Holothuria scabra* from ... [19] Toxicity of essential oil of *Satureja* ... [20] Laboratory tests used to guide antimicrobial ... [21] Potential antibacterial and antioxidant properties of a sulfated polysaccharide from the brown marine algae *Sargassum* ... [22] Antibacterial activity in *Strongylocentrotus droebachiensis* (Echinoidea), *Cucumaria frondosa* (Holothuroidea), and ... [23] Antifungal and antibacterial activity of Porifera extracts from the Moroccan Atlantic ... [24] Screening of antimicrobial activity of marine sponge extracts collected from ... [25] Screening for antibacterial and antifungal activities in marine benthic invertebrates from northern ... [26] Effects of methanolic extract of a soft sponge, *Haliclona* sp. on bacterial cells: Structural degeneration ... [27] Biological activities of extracts from Anadama Sea sponges ... [28] Study of antioxidant, antibacterial and anti-inflammatory activity of cinnamon (*Cinnamomum tamala*), ginger (*Zingiber officinale*) and ... [29] Chitin extraction from shrimp shell waste using ...

پتانسیل خواص ضدباکتریایی و آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های اسفنج دریایی *هالیکلونا کارلا* منطقه جزر و مدی جزیره لارک، خلیج فارس

مریم کریم‌پور MSc

گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران

احسان کامرانی PhD

گروه شیلات، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران

مرتضی یوسف‌زادی PhD

گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران

ملیکا ناظمی PhD

پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان، بندرعباس، ایران

چکیده

اهداف: با توجه به اهمیت بحث سلامت و برخی مضرات ترکیبات مصنوعی موجود، هدف مطالعه حاضر بررسی برخی خواص زیستی از جمله خواص ضدباکتریایی و آنتی‌اکسیدانی اسفنج دریایی *هالیکلونا کارلا* (*Haliclona caerulea*) بود.

مواد و روش‌ها: در مطالعه تجربی حاضر، عصاره‌های آلی ان-هگزان، دی‌اتیل‌اتر و متانول با روش بلایت و دایر از اسفنج دریایی تهیه شدند. سپس فعالیت ضدباکتریایی با روش‌های انتشار دیسک، حداقل غلظت بازدارندگی (MIC)، حداقل غلظت کشندگی (MBC) و فعالیت آنتی‌اکسیدانی با استفاده از ارزیابی قدرت احیاکنندگی و تعیین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل عصاره‌ها سنجیده شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها به‌وسیله آزمون‌های تحلیل واریانس یک‌طرفه و چندمانه‌ای دانکن صورت گرفت. نرم‌افزارهای SPSS 19 و Excel 2013 به کار رفتند.

یافته‌ها: عصاره متانولی بیشترین اثر ضدباکتریایی به‌ویژه نسبت به باکتری‌های گرم‌مثبت *باسیلوس سوبتیلیس* در غلظت ۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و *استافیلوکوکوس اورئوس* در غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر را داشت. عصاره دی‌اتیل‌اتری در غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بیشترین اثر آنتی‌اکسیدانی را نشان داد.

نتیجه‌گیری: عصاره متانولی اسفنج دریایی *هالیکلونا کارلا* خاصیت ضدباکتری بیشتری را نشان می‌دهد و عصاره دی‌اتیل‌اتری این اسفنج خاصیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری دارد.

کلیدواژه‌ها: ضدباکتریایی، آنتی‌اکسیدانی، اسفنج دریایی، خلیج فارس، حداقل غلظت بازدارندگی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۶/۲۶

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۵/۲۹

*نویسنده مسئول: ezas47@gmail.com

مقدمه

با وجود پیشرفت فوق‌العاده در پزشکی، بیماری‌های ناشی از باکتری‌ها و قارچ‌ها هنوز هم یک تهدید عمده برای سلامت عمومی هستند. به‌دلیل تکامل مداوم میکروب‌های بیماری‌زا و مقاومت آنها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها، همیشه تقاضا برای توسعه ترکیبات جدید و موثر ضد میکروبی وجود داشته است. در چند دهه گذشته تحقیقات برای کشف سرخ‌های جدید داروهای ضد میکروبی از خشکی به اقیانوس گرایش یافته است. اقیانوس‌ها حدود ۷۰٪ سطح زمین را پوشانده‌اند و پتانسیل نامحدود زیستی و تنوع شیمیایی دارند [1].

مطالعات متعدد نشان می‌دهد بیشتر ترکیبات طبیعی از بی‌مهرگان دریایی استخراج شده‌اند و ساختارهای پپتیدی، آلکالوئیدی، ترپنوئیدی و استروئیدی دارند [2]. تاکنون تعدادی از ترکیبات فعال

زیستی با درجه عمل مختلف مانند ضدتومور، ضدسرطان، سمیت سلولی، ضدخزه و همچنین ترکیبات آنتی‌بیوتیکی از منابع دریایی استخراج شده است. برخی از این متابولیت‌های ثانویه فعال با منشا دریایی که خواص ضدباکتری، ضدقارچی و ضدویروسی قوی دارند، به‌طور فراوان و متداول به‌عنوان آنتی‌بیوتیک استفاده می‌شوند [3].

اسفنج‌ها، بی‌مهرگان پرسلولی اولیه‌ای هستند که به‌عنوان یک منبع بارز در طول ۵۰ سال گذشته بررسی شده‌اند و دانشمندان به امید جداسازی ترکیبات فعال زیستی برای کمک به انسان مجذب آنها شدند. اسفنج‌ها منابعی از مواد جدید برای درمان تعدادی از بیماری‌ها مانند سرطان، ایدز، عفونت و گستره وسیعی از ویروس‌ها، باکتری‌ها و بیماری‌های قارچی را فراهم کردند. با وجود کشف تعدادی از بیواکتیوها در اسفنج‌ها، تنها تعداد کمی از این ترکیبات تجاری‌سازی شدند. بنابراین کشف اکولوژی شیمیایی متابولیت‌های ثانویه بارز و امیدوارکننده است. برخی از این متابولیت‌های ثانویه مسیرهای مهمی را برای رشد داروهای قوی عرضه می‌کنند [4].

بیش از ۱۵۰۰۰ محصول طبیعی برای اهداف مختلف استفاده شده است. بیشتر این ترکیبات از اسفنج‌های دریایی، ژله‌فیش‌ها، شقایق‌های دریایی، مرجان‌ها، بریوزوئن‌ها، نرم‌تنان، خارپوستان، تونیکاتا و سخت‌پوستان جداسازی شده‌اند [5, 6]. بین موجودات دریایی، اسفنج‌ها با قدمت حیات بیش از ۸۰۰ میلیون سال قدیمی‌ترین و موفق‌ترین گروه جانداران هستند که ترکیبات طبیعی آنها، خواص زیستی متعددی دارد [7]. از جمله این خواص زیستی اثرات ضد میکروبی، آنتی‌اکسیدانی، سرطان، تخریب بافت عصبی، دیابت نوع دو و عفونت‌های قارچی است. این فعالیت‌های زیستی به وجود استرول‌های جدید، متابولیت‌هایی از قبیل استروئیدها، ترپنوئیدها، پپتیدهای دایره‌ای و اسیدهای چرب غیراشباع نسبت داده می‌شوند [8].

آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی می‌توانند با خنثی‌کردن رادیکال‌های آزاد، در پیشگیری از بیماری‌های قلبی-عروقی و برخی اشکال سرطان اهمیت داشته باشند [9]. رادیکال‌های آزاد، یک یا چند الکترون غیرجفت در اوربیتال خالی دارند و شامل آنیون سوپراکسید ($O_2^{\cdot-}$)، هیدروکسیل ($HO^{\cdot}$)، پراکسیل ($ROO^{\cdot}$)، آلکوکسیل ($RO^{\cdot}$) و نیتریک‌اکسید هستند که اکسیژن مرکزی آنها، به‌عنوان گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)، شناخته می‌شود [10]. آنها مستقیماً به مولکول‌های بیولوژیک، مانند لیپیدها، پروتئین‌ها، DNA، RNA و آزنیم‌ها حمله می‌کنند [11]. این گونه‌ها نقش یک همزاد را در ارگانیزم‌ها بازی می‌کنند [10] و گمان می‌رود که مهار آنها، برای کاهش سطح استرس اکسیداتیو ارگانیزم، در جلوگیری و درمان برخی بیماری‌های مزمن و مخرب، مانند پیری، بیماری‌های قلبی و عروقی، التهاب، سکت، دیابت شیرین، سرطان و غیره موثر باشد [12]. بنابراین آنتی‌اکسیدان‌هایی که می‌توانند ROS را مهار کنند، انتظار می‌رود که این اختلالات را بهبود بخشند [14]. این امر می‌تواند به یک تحول عظیم در علم پزشکی منجر شود [15]. به هر حال توجه به اهمیت سلامتی و آگاهی از مصرف مضر آنتی‌اکسیدان‌های صنعتی مانند بوتیل‌هیدروکسی‌تولون (BHT) و بوتیل‌هیدروکسی‌آنیزول (BHA) و غیره منجر به افزایش تقاضا برای مصرف آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی شده است [11, 16].

مطالعه حاضر با هدف بررسی برخی خواص زیستی از جمله خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدباکتریایی اسفنج دریایی *هالیکلونا کارلا*

لازم به ذکر است که در کنترل باکتری، متانول به جای عصاره و از آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین نیز به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC): به منظور تعیین حداقل غلظت بازدارندگی رشد باکتری‌ها توسط عصاره‌های ان-هگزانی، دی‌اتیل‌اتری و متانولی اسفنج دریایی، از لوله‌های آزمایش به شکل رقت سریال ده‌تایی استفاده شد، به طوری که در هر لوله یک میلی‌لیتر محیط کشت به همراه غلظت‌های مناسب از عصاره‌ها (۲۰، ۱۵، ۱۰، ۷/۵، ۵، ۲/۵، ۱/۵، ۰/۷۵، ۰/۵ و ۰/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) وجود داشت. استوک تهیه‌شده از باکتری (غلظت برابر با استاندارد نیم‌مک‌فارلند) با استفاده از محیط کشت مایع، یک به ۱۰۰ رقیق شد تا حاوی $10^8 \times 1/5$ واحد کلونی باکتری باشد. سپس مقدار یک میلی‌لیتر به تمام لوله‌ها (به استثنای لوله‌های کنترل) اضافه شد. در مرحله آخر، لوله‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای 37°C قرار داده شدند. برای تعیین مقدار MIC، اولین لوله‌ای که کدورتی نداشت و به بیان دیگر، رشد باکتری در آن مشاهده نشد، به عنوان عدد MIC منظور شد [19].

تعیین حداقل غلظت کشندگی (MBC): به منظور تعیین حداقل غلظت کشندگی از لوله‌هایی که با افزودن عصاره‌ها، بعد از گذشت دوره زمانی ۲۴ ساعت به صورت شفاف باقی مانده بود و احتمال می‌رفت که باکتری در آنها رشد نکرده باشد، در کنار شعله در پلیت حاوی محیط مولر هینتون آگار کشت داده شد و سپس پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای 37°C قرار گرفتند. اگر کلونی باکتری در سطح محیط ظاهر نمی‌شد، یا حداقل از ۷ کلونی بیشتر نبود، نشان می‌داد که عصاره اثر کشندگی داشته و باکتری را از بین برده است. بدین ترتیب MBC عصاره بر سویه مورد نظر مشخص شد [20].

ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی (ارزیابی قدرت احیاکنندگی): این آزمایش بر مبنای احیا کردن کلرید آهن III (سه‌ظرفیتی) به کلرید آهن II (دو ظرفیتی) توسط عصاره دارای قدرت احیاکنندگی بود. تبدیل رنگ زرد به آبی مبنای سنجش بود.

توانایی عصاره‌ها برای احیای آهن سه‌ظرفیتی طبق روش *دون* و همکاران تعیین شد. در این روش، ۵/۵ میلی‌لیتر از غلظت‌های مختلف عصاره (۲/۵، ۵، ۷/۵، ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) با ۱/۲۵ میلی‌لیتر بافر فسفات (۱/۱ مولار؛ $\text{pH}=6/6$) و ۱/۲۵ میلی‌لیتر فری‌سیانیدپتاسیم (۱٪؛ وزنی/حجمی) مخلوط شد و به مدت ۲۰ دقیقه در حمام آب (WiseBath؛ کره جنوبی) با دمای 50°C قرار گرفت. سپس ۲/۵ میلی‌لیتر از مخلوط برداشته و به آن ۱/۲۵ میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک اسید (۱۰٪، وزنی/حجمی) و ۱/۲۵ میلی‌لیتر آب مقطر و در نهایت ۲/۵ میلی‌لیتر کلرور فریک (۱/۱٪، وزنی/حجمی) اضافه شد. بلافاصله جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۰۰ نانومتر به کمک دستگاه اسپکتروفتومتر (Shimadzu؛ ژاپن) خوانده شد. افزایش جذب نمونه‌ها به معنی افزایش قدرت احیاکنندگی نمونه‌ها است. آب مقطر به عنوان بلانک و آسکوربیک اسید نیز به عنوان استاندارد استفاده شد [11].

ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل (TAC): ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل عصاره‌ها طبق روش *ویجا یا باسکار* و همکاران تعیین شد. برای تهیه محلول TAC (به عنوان معرف) ۷/۴۵ میلی‌لیتر سولفوریک اسید ۰/۶ مولار، ۰/۹۹ گرم سولفات سدیم و ۲۳/۱ گرم آمونیوم مولیبدات مخلوط و با آب مقطر به حجم ۲۵۰ میلی‌لیتر رسانده شد. مقدار ۱/۱ میلی‌لیتر از غلظت‌های مختلف عصاره (۲/۵، ۵، ۷/۵، ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) با یک میلی‌لیتر از محلول TAC مخلوط شد و پس از ورتکس، ۱۵ دقیقه در دمای آزمایشگاه (25°C)

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر یک پژوهش تجربی است.

نمونه‌برداری و عصاره‌گیری: اسفنج‌های دریایی گونه *هالیکلونا کارلا* در اردیبهشت ۱۳۹۳ از منطقه بین جزر و مدی جزیره لارک خلیج فارس جمع‌آوری و با حفظ شرایط بیولوژیک همراه با آب دریا به آزمایشگاه زیست‌شناسی دانشگاه هرمزگان منتقل شدند. به منظور پاک‌سازی نمونه‌ها از آب دریا، نمک اضافی و رسوبات، آنها با آب مقطر شسته شدند. سپس جداسازی اپی‌فیت‌ها و بسترهای سنگی متصل به بافت‌های اسفنجی انجام شد تا نمونه‌ها کاملاً تمیز شوند. بافت‌های اسفنجی به اندازه‌های یک سانتی‌متری با اسکارپر برش زده شدند تا اثرگذاری حلال‌ها روی جاندار بیشتر شود [17].

بافت‌های اسفنجی برای خشک‌شدن در دستگاه فریز درایر (strike102؛ ایتالیا) در دمای -40°C قرار گرفتند. عصاره بافت‌های اسفنجی با استفاده از سه حلال ان-هگزان، دی‌اتیل‌اتر و متانول به ترتیب افزایش قطبیت جدا شدند. حلال‌ها در دستگاه روتاری (strike102؛ ایتالیا) در شرایط خلا تبخیر و عصاره‌ها پس از حل شدن در متانول، در دمای -20°C نگهداری شدند. لازم به ذکر است که تمام مراحل عصاره‌گیری در دمای آزمایشگاه (25°C) انجام شد [17، 18].

ارزیابی فعالیت ضد میکروبی: سویه‌های باکتریایی مورد استفاده در مطالعه شامل باکتری‌های گرم‌مثبت *باسیلوس سوبتیلیس* (*Bacillus subtilis*) و *استافیلوکوکوس اورئوس* (*Staphylococcus aureus*) و باکتری‌های گرم‌منفی *شیگلا فلکسنری* (*Shigella flexneri*)، *سالمونلا تیفی‌موریوم* (*Salmonella typhimurium*)، *اشریشیا کلی* (*Escherichia coli*) و *سودوموناس آئروجینوزا* (*Pseudomonas aeruginosa*) بودند که از باکتری‌های بیماری‌زای انسانی محسوب می‌شوند و از مرکز کلکسیون قارچ و باکتری ایران تهیه شدند.

کشت باکتریایی و آزمون انتشار دیسک: از تمام سویه‌های باکتریایی با روش خطی پلیت تهیه شد و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای 37°C قرار گرفتند تا باکتری‌ها کاملاً رشد کنند. سپس در شرایط کاملاً استریل و در کنار شعله از پلیت کشت باکتری، تک‌کلونی برداشته و در لوله‌های حاوی ۴ میلی‌لیتر محیط کشت مایع لاکتوز براث انتقال داده شد. برای رشد باکتری لوله‌ها در انکوباتور با دمای 37°C به مدت ۴ ساعت قرار گرفتند. غلظت نهایی هر نمونه براساس کدورت نیم‌مک‌فارلند در حدود $10^8 \times 1/5$ واحد کلونی باکتری در میلی‌لیتر تنظیم شد [19].

به منظور بررسی اثرات ضدباکتریایی (کشت چمنی سوپانسیون‌های باکتریایی به وسیله سوآپ استریل) روی محیط آگار، دیسک‌های آماده بلانک (محصول شرکت پادتن طب؛ ایران) به ظرفیت ۲۰ میکرولیتر به فاصله حداقل ۲۵ میلی‌متر از یکدیگر و از لبه پلیت به وسیله یک پنس استریل به دقت روی سطح آگار قرار گرفتند. سپس ۲۰ میکرولیتر از هر کدام از عصاره‌های استریل با غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (وزنی/حجمی) برداشته و به دقت به دیسک‌های بلانک (قطر ۶ میلی‌متر) تزریق شدند و بعد به آرامی دیسک‌ها با فشار پنس در محیط آگار ثابت شدند. قطر هاله‌های عدم رشد بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای 37°C تعیین شد. قطر هاله‌ها به کمک خط‌کش کولیس (Hi Antibiotic Zone Scale) اندازه‌گیری و نتایج میانگین با سه بار تکرار محاسبه شد [19].

عصاره‌های مورد بررسی اثر بازدارندگی رشد بر باکتری‌های مورد مطالعه نداشتند.

حداقل غلظت بازدارندگی در هیچ یک از عصاره‌ها، بر رشد باکتری گرم‌منفی *سودوموناس آئروجینوزا* در دامنه غلظتی مورد مطالعه مشاهده نشد (جدول ۱).

حداقل غلظت کشندگی باکتری عصاره متانولی اسفنج دریایی برای باکتری *باسیلوس سوبتیلیس* ۷/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. در مورد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* هر دو عصاره متانولی و دی‌اتیل‌اتری در غلظت ۱۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اثر کشندگی را نشان دادند. در باکتری *سالمونلا تیفی‌موریوم* تنها عصاره متانولی اسفنج دریایی در غلظت ۱۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اثر کشندگی از خود نشان داد. عصاره ان-هگزانی اسفنج دریایی در مورد هیچ یک از باکتری‌ها اثر کشندگی نشان نداد. در مقایسه عصاره‌ها با آموکسی‌سیلین به‌عنوان کنترل مثبت، عصاره‌ها اثر کشندگی ضعیف‌تری داشتند (جدول ۲).

جدول ۲) حداقل غلظت کشندگی باکتریایی عصاره‌های اسفنجی

کلونی	میکروارگانیزم	غلظت عصاره اسفنجی (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)
۰	<i>باسیلوس سوبتیلیس</i>	۷/۵ (متانولی)
۰	<i>استافیلوکوکوس اورئوس</i>	۱۵ (متانولی)
>۷	<i>سالمونلا تیفی‌موریوم</i>	۱۵ (متانولی)
۰	<i>باسیلوس سوبتیلیس</i>	۲۰ (دی‌اتیل‌اتر)
۰	<i>استافیلوکوکوس اورئوس</i>	۱۵ (دی‌اتیل‌اتر)
۰	<i>باسیلوس سوبتیلیس</i>	۲/۵ (آموکسی‌سیلین)
۰	<i>استافیلوکوکوس اورئوس</i>	۵ (آموکسی‌سیلین)
>۷	<i>سالمونلا تیفی‌موریوم</i>	۰/۷۵ (آموکسی‌سیلین)
>۷	<i>اشریشیا کلی</i>	۵ (آموکسی‌سیلین)

بیشترین میزان قدرت احیاکنندگی در برابر آسکوربیک‌اسید به‌عنوان استاندارد در عصاره دی‌اتیل‌اتری (غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) مشاهده شد (نمودار ۱). میزان قابل توجهی قدرت احیاکنندگی در غلظت ۱ و ۷/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر آسکوربیک‌اسید و غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره متانولی اسفنج دریایی مشاهده شد که براساس شاخص‌های آماری نیز تفاوت معنی‌داری بین این غلظت‌ها وجود نداشت. این در حالی است که کمترین میزان قدرت احیاکنندگی در عصاره ان-هگزانی (غلظت ۱/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) مشاهده شد.

آسکوربیک‌اسید در غلظت ۰/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نیز میزان قابل توجهی قدرت احیاکنندگی داشت که در مقایسه با قدرت احیاکنندگی در عصاره ان-هگزانی اسفنج دریایی در غلظت ۱/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. به‌طور کلی اختلاف معنی‌داری بین عصاره‌های مختلف آلی اسفنج دریایی منطقه جزر و مدی و آسکوربیک‌اسید در غلظت‌های مختلف مشاهده شد ($p < 0.05$; نمودار ۱).

عصاره دی‌اتیل‌اتری اسفنج دریایی در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بالاترین میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی را داشت (نمودار ۲). عصاره ان-هگزانی اسفنج دریایی منطقه جزر و مدی در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و آسکوربیک‌اسید در غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نیز میزان قابل توجهی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی داشتند. بین عصاره‌های نام‌برده اختلاف معنی‌داری وجود نداشت، همچنین عصاره ان-هگزانی منطقه جزر و مدی در غلظت ۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر پایین‌ترین میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی را نشان داد. در تمام عصاره‌های آلی غلظت‌های مختلف اسفنج دریایی

قرار گرفتند. جذب نمونه‌ها در طول موج ۶۹۵ نانومتر خوانده شد. افزایش جذب نمونه‌ها به‌معنی افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها است. آب‌مقطر به‌عنوان بلانک و آسکوربیک‌اسید نیز به‌عنوان استاندارد استفاده شد [21].

تجزیه و تحلیل داده‌ها به‌وسیله آزمون‌های آماری تحلیل واریانس یک‌طرفه و آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵٪ صورت گرفت. بدین منظور نرم‌افزارهای آماری SPSS 19 و Excel 2013 به کار رفتند.

یافته‌ها

عصاره متانولی اسفنج دریایی بیشترین اثر ضدباکتریایی را روی باکتری گرم‌مثبت *باسیلوس سوبتیلیس* نسبت به سایر عصاره‌ها نشان داد. عصاره‌های دی‌اتیل‌اتری و ان-هگزانی اسفنج مورد آزمایش خاصیت ضدباکتریایی متوسطی نشان دادند (جدول ۱). عصاره‌های متانولی و دی‌اتیل‌اتری بیشترین خاصیت ضدباکتریایی را بر باکتری‌های گرم‌مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* و گرم‌منفی *شیگلا فلکسنری* داشتند. عصاره دی‌اتیل‌اتری اثر ضدباکتریایی بیشتری نسبت به سایر عصاره‌های مورد مطالعه بر باکتری گرم‌منفی *سالمونلا تیفی‌موریوم* نشان داد.

عصاره متانولی اسفنج دریایی بر باکتری‌های *اشریشیا کلی* و *سودوموناس آئروجینوزا* اثر ضدباکتریایی بیشتری نسبت به سایر عصاره‌ها داشت.

تمامی عصاره‌های اسفنج دریایی منطقه جزر و مدی در مقایسه با آموکسی‌سیلین اثر بازدارندگی رشد ضعیفی بر باکتری‌های مورد مطالعه داشتند. حداقل غلظت بازدارندگی عصاره‌ها مربوط به عصاره‌های متانولی اسفنج دریایی بر باکتری گرم‌مثبت *باسیلوس سوبتیلیس* بود و به مقدار ۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مشاهده شد (جدول ۱).

جدول ۱) فعالیت ضدباکتریایی عصاره‌های آلی اسفنجی روی میکروارگانیزم‌های مورد مطالعه

میکروارگانیزم	متانولی		دی‌اتیل‌اتر		ان-هگزانی		آمپی‌سیلین*	
	MIC ^b	IZ ^a	MIC	IZ	MIC	IZ	MIC	IZ
<i>باسیلوس سوبتیلیس</i>	۱۹	۲/۵	۱۴	۷/۵	۸/۷	۱۰	۱۹	۱/۵
<i>استافیلوکوکوس اورئوس</i>	۱۳	۵	۱۳	۷/۵	۹	۱۵	۲۲	۰/۷۵
<i>شیگلا فلکسنری</i>	۱۰	۷/۵	۱۰	۱۰	۷/۳	۱۵	۱۹	۱/۵
<i>سالمونلا تیفی‌موریوم</i>	۹	۷/۵	۱۱	۱۰	۱۰	۱۰	۱۹	۰/۵
<i>اشریشیا کلی</i>	۱۰	۷/۶	۱۵	۷/۵	+	۱۱	۲/۵	۲/۵
<i>سودوموناس آئروجینوزا</i>	۱۰	+	۸	+	۹	+	۱۰	+

* آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین با غلظت ۵ میلی‌گرم به‌ازای هر دیسک مورد آزمون قرار گرفت؛ ^a قطر هاله عدم رشد شامل قطر دیسک (۶ میلی‌متر) بود، عدم فعالیت (-)، فعالیت متوسط (۱۴-۷)، فعالیت بالا (۱۴+)، ^b حداقل غلظت بازدارندگی براساس میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود، + نمونه‌هایی که کدورت در آنها مشاهده شد.

در صورتی که عصاره دی‌اتیل‌اتری اسفنج دریایی بر باکتری گرم‌منفی *اشریشیا کلی* و عصاره ان-هگزانی اسفنج دریایی بر باکتری‌های گرم‌مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* و گرم‌منفی *شیگلا فلکسنری* اثر ضدباکتریایی ضعیف‌تری داشتند و حداقل غلظت بازدارندگی در غلظت ۱۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مشاهده شد. همچنین، عصاره متانولی اسفنج دریایی بر باکتری‌های گرم‌منفی *اشریشیا کلی* در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اثر بازدارندگی رشد داشت و در عصاره ان-هگزانی آن فاقد اثر بازدارندگی رشد بود. در بازه غلظتی ۰/۱ تا ۱/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر هیچ یک از

به‌عنوان دو روش مناسب در این راستا کاربرد دارند. نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره متانولی استخراج‌شده از اسفنج دریایی هالیکلونا کارلا به‌طور موثری در برابر ارگانیزم‌های گرم‌مثبت خاصیت ضدباکتریایی داشت. ارگانیزم‌هایی مانند باکتری *باسیلوس سوبتیلیس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* به‌وسیله عصاره‌های قطبی مهار شدند.

در پژوهش دیگری در رابطه با خواص ضدباکتریایی عصاره‌های خشک متانولی اسفنج‌های سواحل مورکان واقع در اقیانوس اطلس با استفاده از روش دیسک روی باکتری *باسیلوس سوبتیلیس* مشخص شد که عصاره‌های خشک متانولی اسفنج‌های *هالیکلونا مدیترنیا* (*Haliclona mediterranea*)، *هاپلوس‌کلریدا* (*Haplosclerida* sp9)، *سناچیرلا تارنتین* (*Cinachyrella tarentine*)، *ایرسینیا اوروس* (*Ircinia oros*)، *کلیونا سلاتا* (*Cliona celata*)، *آکسینلا پولیپوئیدز* (*Axinella polypoidea*)، *هاپلوس‌کلریدا آدوسیدا* (*Haplosclerida adocia*) و *کلیونا ویریدیس* (*Cliona viridis*) روی باکتری مورد آزمایش اثری ندارند [23].

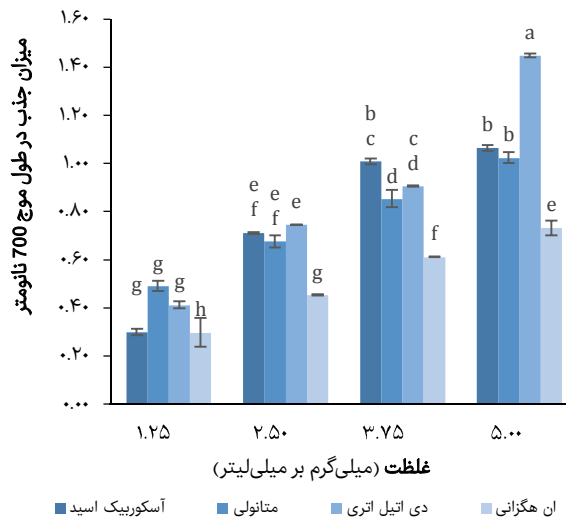
در یک پژوهش در رابطه با اثر ضدباکتریایی عصاره اتیل‌استاتانی اسفنج‌های سواحل تونس با استفاده از روش دیسک مشخص شد که اسفنج‌های اسپونجیا (*Spongia* spp.)، *هیپوسپونجیا کومپونیس* (*Hippospongia communis*) و *ایرسینیا سارکوترگوس* (*Ircinia sarcotragus*) اثر ضدباکتریایی روی باکتری‌های گرم‌منفی ندارند، اما اسفنج‌های *آجلاس* / *اورویدز* (*Agelas oroides*)، *ایرسینیا اسپینوسولا* (*I. spinosula*)، *آکسینلا دامیکورنيس* (*Axinella damicornis*) و *پتروزینا فیکي‌فورميس* (*Petrosia ficiformis*) هاله عدم رشد ایجاد کردند [24].

در مطالعه حاضر عصاره متانولی استخراج‌شده از اسفنج دریایی *هالیکلونا کارلا* در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اثر باکتریواستاتیک روی باکتری *اشریشیا کلی* داشت، اما اثر باکتریوسایدی روی باکتری مذکور نشان نداد. همچنین نتایج آزمایشات این مطالعه نشان داد هیچ کدام از عصاره‌های مورد آزمایش روی باکتری *سودوموناس آئروچینوزا* اثر ضدباکتریایی نداشتند.

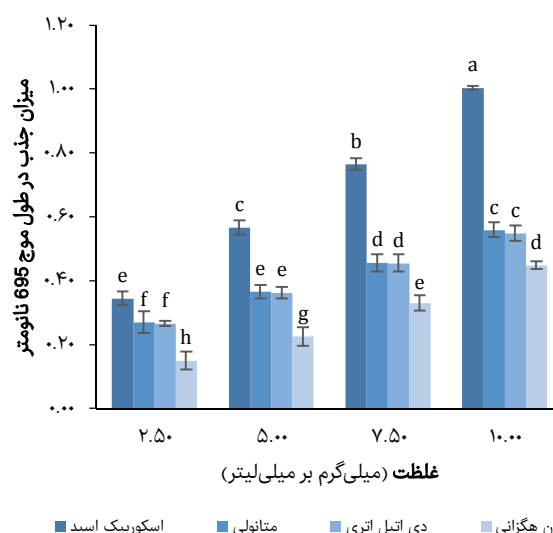
گزارشاتی نیز مبنی بر فعالیت ضدباکتریایی اسفنج‌ها در برابر باکتری‌های گرم‌منفی بیان شده است [25]. در پژوهش *دارا* و همکاران روی باکتری *اشریشیا کلی* از عصاره متانولی اسفنج جنس *هالیکلونا* مشخص شد که عصاره متانولی روی این باکتری اثر ضدباکتریایی نداشت [26]. بررسی اثر ضدباکتریایی عصاره‌های مختلف اسفنج *آیوفون لاویستیلوس* (*Iophon laevistylus*) از جزیره فارور واقع در خلیج فارس که با استفاده از روش MIC روی باکتری *سودوموناس آئروچینوزا* انجام شده بود، نشان داد که هیچ کدام از عصاره‌های مورد آزمایش خواص باکتریواستاتیک و باکتریوسایدی ندارند [17]. نتایج حاصل از مطالعه حاضر با نتایج مطالعات پیشین مطابقت دارد.

پژوهش‌های انجام‌شده در رابطه با اثر ضدباکتریایی عصاره اسفنجی نسبت به باکتری‌های گرم‌منفی مورد نظر در مطالعه حاضر نشان می‌دهد این باکتری‌ها نسبت به عصاره‌های مورد آزمایش بسیار قوی عمل کرده به‌طوری که در موارد اندکی این عصاره‌ها تأثیر ضدباکتریایی نسبت به این باکتری‌ها دارند.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد عصاره متانولی استخراج‌شده از



نمودار ۱ مقایسه قدرت احیاکنندگی عصاره‌های آلی اسفنج دریایی با آسکوربیک‌اسید به‌عنوان استاندارد در غلظت‌های مختلف (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) غلظت‌های آسکوربیک‌اسید یک به ۵ غلظت عصاره‌های آلی بودند (حروف غیرمشابه بیانگر اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال $p \leq 0.05$ است)



نمودار ۲ مقایسه ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل عصاره‌های آلی اسفنج دریایی با آسکوربیک‌اسید به‌عنوان استاندارد در غلظت‌های مختلف (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) غلظت‌های آسکوربیک‌اسید یک به ۱۰ غلظت عصاره‌های آلی بودند (حروف غیرمشابه بیانگر اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال $p \leq 0.05$ است)

بحث

هدف مطالعه حاضر بررسی برخی خواص زیستی (آنتی‌اکسیدانی و ضدباکتریایی) اسفنج دریایی *هالیکلونا کارلا* بود.

مطالعات متعدد نشان می‌دهند اغلب ترکیبات طبیعی از بی‌مهرگان دریایی استخراج شده‌اند و ساختارهای پپتیدی، آلکالوئیدی، ترپنوئیدی و استروئیدی دارند [2]. همچنین اسفنج‌های دریایی منبع مهمی از استروئیدها، آلکالوئیدها، پپتیدها و اسیدهای چرب اشباع‌نشده هستند که چندین فعالیت متنوع زیستی برای آنها بیان شده است [8].

در بررسی و سنجش اثر ضدباکتریایی در اکثر آزمایشات دو روش انتشار از دیسک و رقیق‌سازی محیط کشت استفاده می‌شود [22] که

اسفنج دریایی *هالیکلونا کارلا* روی باکتری‌های گرم‌مثبت *باسیلوس سوبتیلیس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* اثر باکتریواستاتیک و عصاره‌های متانولی و دی‌اتیل‌اتری روی این آنها اثر باکتریوسایدی داشتند.

در مطالعه دیگری روی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* با استفاده از روش برات از عصاره‌های ان-هگزانی و دی‌کلرومتانولی اسفنج دریایی آنادام تایلند، مشخص شد که اسفنج‌های *آکسینسیا (Axinyssa spp.)*، *هالیچوندریا (Halichondria spp.)* و *کوندروسیا (Chondrosia spp.)* روی باکتری مورد آزمایش اثری نداشتند، اما عصاره ان-هگزانی و دی‌کلرومتانولی اسفنج‌ها دارای اثر باکتریواستاتیک بودند [27].

طبق مطالعات در سال‌های اخیر آنتی‌اکسیدان‌ها در درمان بیماری‌های گوناگون مزمن و عفونی استفاده می‌شوند. مطالعات اپیدمیولوژی و آزمایشگاهی نیز بر تخریب سلولی اکسیداتیو ناشی از یک ناهماهنگی بین سیستم تولید و مهار رادیکال آزاد، به‌عنوان اولین علت بیماری التهاب، ناراحتی‌های قلبی-عروقی، سرطان، پیری و غیره دلالت می‌کنند [28]. ترکیبات شیمیایی موجود در اسفنج‌ها می‌تواند به‌عنوان آنتی‌اکسیدان عمل نماید و از اختلالات ناشی از آسیب‌های اکسیداتیو پیشگیری کند. یکی از مکانیزم‌هایی که ترکیبات ضد اکسیدان از طریق آن اثر خود را اعمال می‌کنند، خاصیت احیاکنندگی است. این ترکیبات با احیا کردن رادیکال‌های آزاد، مانع ایجاد اثرات مخرب آنها می‌شوند. در مطالعه حاضر، از توانایی احیاکنندگی این ترکیبات برای تبدیل آهن سه‌ظرفیتی به آهن دو ظرفیتی استفاده شد. تبدیل آهن سه‌ظرفیتی به آهن دو ظرفیتی توسط ترکیبات احیاکننده، باعث ایجاد رنگ سبز-آبی می‌شود که این تغییر رنگ مبنای آزمایشات رنگ‌سنجی است. هر چه شدت رنگ بیشتر باشد، فعالیت احیاکنندگی ترکیب بیشتر است. نتایج مطالعات متعددی نشان داد که عصاره‌های مورد آزمایش به‌عنوان عاملی احیاکننده، می‌توانند آهن سه‌ظرفیتی را به آهن دو ظرفیتی تبدیل کنند. همچنین، آنها بیان کردند که میزان قدرت احیاکنندگی با افزایش غلظت، رابطه مستقیم دارد. نتایج حاصل از مطالعه حاضر نیز با مطالعات پیشین مطابقت داشت.

براساس نتایج مطالعه حاضر با افزایش غلظت، میزان قدرت احیاکنندگی نیز افزایش می‌یابد. بنابراین، می‌توان قدرت احیاکنندگی را به ترکیبات زیستی شرکت‌کننده با خاصیت ضد اکسیدانی نسبت داد [29].

مطالعات متعددی مبنی بر وجود ترکیبات فعال زیستی قوی در اسفنج‌های دریایی به سبب دارا بودن پتانسیل دارویی انجام شده است. نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان داد که عصاره‌های قطبی و نیمه‌قطبی اسفنج دریایی *هالیکلونا کارلا* نسبت به عصاره‌های غیرقطبی اثر ضدباکتری و آنتی‌اکسیدانی قوی‌تری دارند، می‌توان نتیجه گرفت ترکیبات ضدباکتری و آنتی‌اکسیدانی این اسفنج در عصاره‌های قطبی و نیمه‌قطبی قابلیت انحلال بیشتری دارند به‌طوری که عصاره متانولی خاصیت ضدباکتری بیشتر و عصاره دی‌اتیل‌اتری خاصیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری از خود نشان دادند. با توجه به نتایج حاصل شده پیشنهاد می‌شود ضمن تخلیص ترکیبات، شناسایی و تعیین نقش اختصاصی هر یک از آنها، برای ساخت ترکیبات دارویی و پزشکی انجام شود. در نتیجه می‌توان اسفنج دریایی *هالیکلونا کارلا* را به‌عنوان یک منبع بالقوه از ترکیبات فعال زیستی طبیعی با فعالیت ضدباکتریایی و آنتی‌اکسیدانی معرفی کرد.

از جمله محدودیت‌های پژوهش حاضر در دسترس نبودن همیشگی نمونه‌های جزومدی اسفنج دریایی *هالیکلونا کارلا* درفصول خاص به‌علت شرایط جوی حاکم در جنوب کشور بود. پیشنهاد می‌شود با توجه به مقاومت دارویی در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها و نیاز روزافزون بشر به داروها، پژوهش‌هایی پیرامون آنالیز شیمیایی و شناسایی ترکیب یا ترکیبات موثر در خصوص فعالیت‌های ضدباکتریایی، آنتی‌اکسیدانی و تعیین نقش اختصاصی هر یک از آنها برای ساخت ترکیبات دارویی و پزشکی انجام شود.

نتیجه‌گیری

عصاره متانولی اسفنج دریایی *هالیکلونا کارلا* خاصیت ضدباکتری بیشتری را نشان می‌دهد و عصاره دی‌اتیل‌اتری این اسفنج خاصیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری دارد.

تشکر و قدردانی: از مسئولان محترم دانشگاه هرمزگان که ضمن حمایت مالی، محیط و امکانات پژوهشی مناسب را برای پژوهش حاضر فراهم کردند و نیز از تمامی همکارانی که در انجام عملیات میدانی و آزمایشگاهی مشارکت داشتند، سپاس‌گزاری و تقدیر می‌شود.

تأییدیه اخلاقی: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشد.

تعارض منافع: نویسندگان اعلام می‌دارند هیچ‌گونه تعارض منافی میان آنها وجود ندارد.

سهم نویسندگان: مریم کریم‌پور (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه پژوهشگر اصلی/نگارنده بحث (۲۵٪)؛ احسان کامرانی (نویسنده دوم)، روش‌شناس (۲۵٪)؛ مرتضی یوسف‌زادی (نویسنده سوم)، تحلیلگر آماری (۲۵٪)؛ ملیکا ناظمی (نویسنده چهارم)، پژوهشگر کمکی (۲۵٪)

منابع مالی: پژوهش حاضر تحت حمایت مالی دانشگاه هرمزگان بوده است.

منابع

- 1- De Vries DJ, Hall MR. Marine biodiversity as a source of chemical diversity. *Drug Dev Res.* 1994;33(2):161-73.
- 2- Datta D, Nath Talapatra S, Swarnakar S. Bioactive compounds from marine invertebrates for potential medicines - an overview. *Int Lett Nat Sci.* 2015;34:42-61.
- 3- Villa FA, Gernwick L. Marine natural product drug discovery: Leads for treatment of inflammation, cancer, infections and neurological disorders. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2010;32(2):228-37.
- 4- Majik MS, Shirodkar D, Rodrigues C, D'Souza L, Tilvi S. Evaluation of single and joint effect of metabolites isolated from marine sponges, *Fasciospongia cavernosa* and *Axinella donnani* on antimicrobial properties. *Bioorg Med Chem Lett.* 2014;24(13):2863-6.
- 5- Blunt JW, Copp BR, Keyzers RA, Munro MH, Prinsep MR. Marine natural products. *Nat Prod Rep.* 2016;33(3):382-431.
- 6- Salomon CE, Magarvey NA, Sherman DH. Merging the potential of microbial genetics with biological and chemical diversity: An even brighter future for marine natural product drug discovery. *Nat Prod Rep.* 2004;21(1):105-21.
- 7- Qaralleh H, Idid S, Saad S, Susanti D, Taher M, Khleifat K. Antifungal and antibacterial activities of four Malaysian sponge species (Petrosiidae). *Journal de Mycologie Médicale.* 2010;20(4):315-20. [French]

Gulf. J Mycol Med. 2013;23(4):225-9.

19- Yousefzadi M, Riahi-Madvar A, Hadian J, Rezaee F, Rafiee R, Biniaz M. Toxicity of essential oil of *Satureja khuzistanica*: In vitro cytotoxicity and anti-microbial activity. J Immunotoxicol. 2014;11(1):50-5.

20- Rosenblatt JE. Laboratory tests used to guide antimicrobial therapy. Mayo Clin Proc. 1991;66(9):942-8.

21- Vijayabaskar P, Vaseela N, Thirumaran G. Potential antibacterial and antioxidant properties of a sulfated polysaccharide from the brown marine algae *Sargassum swartzii*. Chin J Nat Med. 2012;10(6):421-8.

22- Haug T, kjuul AK, Styrvold OB, Sandsdalen E, Olsen ØM, Stensvåg K. Antibacterial activity in *Strongylocentrotus droebachiensis* (Echinoidea), *Cucumaria frondosa* (Holothuroidea), and *Asterias rubens* (Asteroidea). J Invertebr Pathol. 2002;81(2):94-102.

23- El-Amraoui B, Biard JF, Uriz MJ, Rifai S, Fassouane A. Antifungal and antibacterial activity of Porifera extracts from the Moroccan Atlantic coasts. Journal de Mycologie Médicale. 2010;20(1):70-4. [French]

24- Touati I, Chaieb K, Bakhrout A, Gaddour K. Screening of antimicrobial activity of marine sponge extracts collected from Tunisian coast. Journal de Mycologie Médicale. 2007;17(3):183-7. [French]

25- Tadesse M, Gulliksen B, Strøm MB, Styrvold OB, Haug T. Screening for antibacterial and antifungal activities in marine benthic invertebrates from northern Norway. J Invertebr Pathol. 2008;99(3):286-93.

26- Darah I, Lim CL, 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.

27- Pedpradab P, Molex W, Nukoolkarn V, Darumas D. Biological activities of extracts from Anadam Sea sponges, Thailand. EurAsian J Biosci. 2010;4:63-9.

28- Thakur R, Yadav K, Khadka KB. Study of antioxidant, antibacterial and anti-inflammatory activity of cinnamon (*Cinamomum tamala*), ginger (*Zingiber officinale*) and turmeric (*Curcuma longa*). Am J Life Sci. 2013;1(6):273-7.

29- Ghorbel-Bellaaj O, Younes I, Maâlej H, Hajji S, Nasri M. Chitin extraction from shrimp shell waste using *Bacillus* bacteria. Int J Biol Macromol. 2012;51(5):1196-201.

8- Gupta J, Misra S, Mishra SK, Srivastava S, Srivastava MN, Lakshmi V, et al. Antifilarial activity of marine sponge *Haliclona oculata* against experimental *Brugia malayi* infection. Exp Parasitol. 2012;130(4):449-55.

9- Ferreira ICFR, Baptista P, Vilas-Boas M, Barros L. Free-radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushrooms from northeast Portugal: Individual cap and stipe activity. Food Chem. 2007;100(4):1511-6.

10- Zou Y, Lu Y, Wei D. Antioxidant activity of a flavonoid-rich extract of *Hypericum perforatum* L. in vitro. J Agric Food Chem. 2004;52(16):5032-9.

11- Duan XJ, Zhang WW, Li XM, Wang BG. Evaluation of antioxidant property of extract and fractions obtained from a red alga, *Polysiphonia urceolata*. Food Chem. 2006;95(1):37-43.

12- Fu L, Xu BT, Xu XR, Gan RY, Zhang Y, Xia EQ, et al. Antioxidant capacities and total phenolic contents of 62 fruits. Food Chem. 2011;129(2):345-50.

13- Wu SJ, Ng LT. Antioxidant and free radical scavenging activities of wild bitter melon (*Momordica charantia* Linn. var. *abbreviata* Ser.) in Taiwan. LWT Food Sci Technol. 2008;41(2):323-30.

14- Shankarlal S, Prabu K, Natarajan E. Antimicrobial and antioxidant activity of purple Sea urchin shell (*Salmacis virgulata* L. Agassiz and Desor 1846). Am Eurasian J Sci Res. 2011;6(3):178-81.

15- Ratnam DV, Ankola DD, Bhardwaj V, Sahana DK, Kumar MN. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. J Control Release. 2006;113(3):189-207.

16- Zhou D, Qin L, Zhu B, Li D, Yang J, Dong X, et al. Optimisation of hydrolysis of purple sea urchin (*Strongylocentrotus nudus*) gonad by response surface methodology and evaluation of in vitro antioxidant activity of the hydrolysate. J Sci Food Agric. 2012;92(8):1694-701.

17- Nazemi M, Khoshkhoo Z, Motalebi AA, 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):107-10.

18- Mohammadizadeh F, Ehsanpor M, Afkhami M, Mokhlesi A, Khazaali A, Montazeri S. Evaluation of antibacterial, antifungal and cytotoxic effects of *Holothuria scabra* from the North Coast of the Persian