



## بررسی اثرات ضدباکتریایی جلبک‌های دریایی *Laurencia snyderiae*

### و *Sargassum angustifolium* علیه پاتوژن‌های انسانی

بهروز درخشش<sup>۱\*</sup>، مرتضی یوسف‌زادی<sup>۲</sup>، محمد افشارنسب<sup>۳</sup>، وحید یگانه<sup>۴</sup>، عقیل دشتیاننسب<sup>۴</sup>

<sup>۱</sup> گروه زیست فناوری، مرکز مطالعات و پژوهش‌های خلیج فارس، دانشگاه خلیج فارس

<sup>۲</sup> گروه گیاهان دارویی، پژوهشکده علوم پایه کاربردی جهاد دانشگاهی، دانشگاه شهید بهشتی

<sup>۳</sup> بخش بهداشت و بیماری‌های آبزیان، مؤسسه تحقیقات شیلات ایران

<sup>۴</sup> گروه میکروبیولوژی، بخش بهداشت و بیماری‌های آبزیان، پژوهشکده میگوی کشور

## چکیده

زمینه: امروزه استفاده گسترده از آنتی‌بیوتیک‌ها باعث به‌وجود آمدن سویه‌های مقاوم میکروارگانیسم‌ها و افزایش روزافزون مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سراسر جهان شده است. از این رو تحقیقات در رابطه با عوامل ضد میکروبی جدید که به‌طور طبیعی تولید می‌شوند، برای دستیابی به منابع نوین دارویی از اهمیت فراوانی برخوردار است. بر اساس پژوهش‌های انجام شده برخی از جلبک‌های پرسلولی دارای خواص ضدباکتریایی و ضدقارچی قابل ملاحظه‌ای می‌باشند.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش اثرات ضدباکتریایی عصاره‌های آلی جلبک‌های پرسلولی لرنسیا اسپیندیریا و «سارگاسوم انگوسیتینیوم» جمع‌آوری شده از سواحل بندر بوشهر روی ۳ سویه باکتریایی گرم مثبت به نام‌های «استوپتوکوکوس موتانس»، «استوپتوکوکوس سالیواریس»، «استوپتوکوکوس سانگوسیس»، و ۴ سویه باکتریایی گرم منفی به نام‌های «سالمونلاتیفی»، «پروتئوس وولگاریس»، «شیکلا فلکسینو» و «میکروکوکوس لوتئوس» مورد آزمایش قرار گرفت. عصاره‌گیری به‌روش غوطه‌وری انجام شد و عصاره‌های متانولی و کلروفرمی به‌دست آمدند. اثرات ضدباکتریایی عصاره‌های نهایی به دو روش انتشار در آگار به وسیله دیسک و روش رقت‌های متوالی در لوله جهت تعیین حداقل غلظت بازدارنده (MIC) بررسی شد.

یافته‌ها: بر اساس نتایج به‌دست آمده، جلبک‌های این پژوهش بیشترین تأثیر ضدباکتریایی را علیه باکتری گرم منفی *S.typhi* نشان داده‌اند و باکتری گرم منفی *M.luteus* بیشترین مقاومت را نسبت به عصاره‌های آلی جلبک‌های این آزمون از خود نشان داده است. نتیجه‌گیری: جلبک قرمز *L.snyderiae* نسبت به جلبک قهوه‌ای *S.angustifolium* از اثرات ضدباکتریایی قوی‌تری برخوردار است.

واژگان کلیدی: *Laurencia snyderiae*، *Sargassum angustifolium*، خواص ضدباکتریایی، MIC

دریافت مقاله: ۸۸/۱۱/۲۹- پذیرش مقاله: ۸۹/۳/۲۶

\*بوشهر، دانشگاه خلیج فارس، مرکز مطالعات و پژوهش‌های خلیج فارس

E-mail: behruzdrakhshesh@yahoo.com

## مقدمه

*Micrococcos luteus* مورد ارزیابی قرار گرفت.

## مواد و روش کار

## تهیه و آماده‌سازی نمونه‌های جلبکی

نمونه‌برداری جلبک‌های *L. snyderiae* (از شاخه‌ی Rhodophyta) و *S. angustifolium* (از شاخه‌ی Phaeophyta) در فاصله زمانی ۲۴ آذر ماه الی ۲۹ آذر ماه ۱۳۸۶ از منطقه بین جزر و مدی و منطقه زیر جزر و مدی ساحل بندر بوشهر انجام گردید.

نمونه‌های جمع‌آوری شده درون ظروف شیشه‌ای حاوی آب دریا نگهداری و سپس به آزمایشگاه منتقل شدند. مقداری از نمونه‌ها نیز جهت شناسایی و تأیید برای کارشناسان مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی هرمزگان ارسال گردیدند.

## عصاره‌گیری

ابتدا جلبک‌ها را کاملاً و با دقت شسته و از شن و ماسه و جانداران اپیفیت کاملاً عاری گردیدند. سپس جلبک‌ها را درون آب مقطر غوطه‌ور کرده (برای خارج شدن املاح) و هر چند ساعت آب آنها تعویض گردید. سپس جلبک‌ها روی پارچه تمیزی در سایه گسترانیده و طی سه روز خشک شدند. در مرحله بعد نمونه‌ها توسط آسیاب برقی کاملاً به صورت پودر درآمدند (۴).

عصاره‌گیری از جلبک‌ها به روش غوطه‌وری ۱۰ درصد جرمی-حجمی با استفاده از حلال‌های کلروفرم ( $\text{CHCl}_3$ ) و متانول (MeOH) به این ترتیب انجام پذیرفت که در ابتدا مقدار ۲۰۰ گرم از پودر خشک هر کدام از گونه‌های جلبکی توزین شده و به ظروف شیشه‌ای منتقل شدند سپس ۲۰۰۰ میلی‌لیتر متانول به آنها افزوده و پس از تکان دادن به مدت ۴۸ ساعت در تاریکی نگهداری گردیدند. عصاره‌های حاصل را صاف

جلبک‌ها منبعی غنی از ترکیبات مفید و فعال زیستی می‌باشند. تاکنون ترکیبات زیستی متعدد و با گستره کاربردی متنوعی همچون اثرات آنتی‌بیوتیکی، ضدویروسی، ضدقارچی و ضدسرطانی از جلبک‌های پرسلولی شناسایی و مشتق شده‌اند که بسیاری از متابولیت‌های اولیه و یا ثانویه این جانداران می‌توانند به مواد فعال مورد علاقه صنایع دارویی تبدیل شوند (۱).

در سال‌های اخیر استفاده گسترده از آنتی‌بیوتیک‌ها باعث به‌وجود آمدن سویه‌های مقاوم میکروارگانیسم‌ها و افزایش روزافزون مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سراسر جهان شده است. از این رو تحقیقات در رابطه با عوامل ضد میکروبی جدید که به‌طور طبیعی تولید می‌شوند به‌منظور دستیابی به منابع نوین دارویی از اهمیت فراوانی برخوردار است. براساس پژوهش‌های انجام شده برخی از جلبک‌های ماکروسکوپی دارای خواص ضدباکتریایی و ضدقارچی قابل ملاحظه‌ای می‌باشند، لذا برای بررسی این اثر تاکنون عصاره سلولی گونه‌های جلبکی فراوانی در محیط آزمایشگاه (*in vitro*) علیه پاتوژن‌های مختلف مورد آزمایش قرار گرفته‌اند و اطلاعات به‌دست آمده در این مقطع برای شناسایی آن ترکیبات خاص سلولی و در نهایت تهیه داروها در پژوهش‌های آینده استفاده می‌شوند (۲ و ۳).

در پژوهش حاضر اثرات ضدباکتریایی دو گونه جلبکی (*Sargassum angustifolium*) و (*Laurencia snyderiae*) (از گونه‌های جلبکی غالب سواحل بوشهر) علیه ۷ سویه از پاتوژن‌های باکتریایی انسانی به نام‌های *Streptococcus salivaris*، *Streptococcus mutans*، *Streptococcus sanguis*، *Salmonella typhi*، *Proteus vulgaris* و *Shigella flexniu* و

(Muller-Hinton agar) بود (۶).

در روش انتشار دیسک پس از تلقیح باکتریایی (کشت چمنی سوسپانسیون‌های باکتریایی به‌وسیله سوآب استریل) روی محیط آگار، دیسک‌های آماده بلانک محصول شرکت پادتن طب به ظرفیت ۲۵ میکرولیتر به‌فاصله حداقل ۲۵ میلی‌متر از یکدیگر و از لبه پلیت به‌وسیله یک پنس استریل به‌دقت روی سطح آگار قرار گرفتند. سپس مقدار ۲۰ میکرولیتر از هر کدام از عصاره‌های استریل با غلظت (w/v) ۰/۲ جرمی-حجمی برداشته و به‌دقت به دیسک‌های بلانک تزریق شدند و بعد به آرامی دیسک‌ها با فشار پنس در محیط آگار ثابت شدند. سپس پلیت‌ها به مدت ۳۰ دقیقه برای پیش انتشار درون یخچال با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. بعد از این مرحله پلیت‌ها به انکوباتور با دمای ۳۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴-۱۸ ساعت منتقل شدند. پس از این مدت قطر هاله عدم رشد اطراف دیسک توسط کولیس به دقت اندازه‌گیری شد (۶).

آزمون‌های حساسیت ضدباکتریایی به‌روش انتشار دیسک با ۳ مرتبه تکرار انجام گرفتند و از نتایج به‌دست آمده در هر مرحله میانگین گرفته شد. به منظور کنترل نتایج آزمون حساسیت ضدباکتریایی از آنتی‌بیوتیک تجاری آمپی‌سیلین (Ampicillin) به‌عنوان کنترل مثبت در این پژوهش استفاده گردید (جدول ۱).

در این پژوهش جهت تعیین حداقل غلظت بازدارنده از روش رقت‌های متوالی در لوله برای عصاره‌های جلبکی در دامنه بین ۳۰-۰/۱۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر اندازه‌گیری شد. در این روش ۱۲ لوله را به شماره‌های ۱ تا ۱۲ مشخص نموده و سپس به تمامی لوله‌ها به جز لوله شماره ۲ به مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر محیط مولر-هینتون مایع استریل (Muller-Hinton broth) افزوده

کرده و با استفاده از دستگاه تبخیرکننده گردان (rotary) در فشار کاهش یافته و در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد تغلیظ گردیدند و سپس زیر هود خشک شدند. عصاره‌های متانولی حاصل به درون پتريدیش‌های دیش‌های تمیز منتقل و در زیر هود لامینار خشک شدند. عصاره‌های متانولی خشک در ۳۰۰ میلی‌لیتر آب حل و با کلروفورم (۳×۱۰۰ میلی‌لیتر) استخراج گردیدند، بدین ترتیب برش کلروفورمی حاصل شد (۴).

عصاره‌ها برای تهیه غلظت‌های ۰/۲ جرمی-حجمی درون دی متیل سولفواکساید (DMSO) حل شدند و سپس هر کدام با عبور از فیلترهای میکروبی با قطر ۰/۴۵ میکرون استریل گردیدند (۵).

#### آزمون‌های ضد میکروبی

سویه‌های باکتریایی مورد استفاده در این تحقیق شامل باکتری‌های گرم مثبت *Streptococcus mutans* PTCC 1219، *Streptococcus salivaris* PTCC 1448، *Streptococcus sanguis* PTCC 1449 و باکتری‌های گرم منفی *Salmonella* ATCC 19430، *Proteus vulgaris* PTCC 1079، *typhi*، *Shigella flexniu* PTCC 1234 و *Micrococcos luteus* ATCC 10240 بودند.

برای بررسی اثرات ضدباکتریایی از آزمون حساسیت ضد میکروبی (آنتی‌بیوگرام) به‌روش اصلاح شده انتشار دیسک (Agar disk diffusion) و آزمون کمی حداقل غلظت بازدارنده به‌روش رقت‌های متوالی لوله (Serial tubes dilutions) استفاده گردید.

سوسپانسیون‌های باکتریایی مورد استفاده در آزمون‌های آنتی‌بیوگرام مطابق با استاندارد ۰/۵ مک فارلند از کشت‌های یک روزه سویه‌های باکتریایی تهیه گردیدند. محیط کشت مورد استفاده در آزمون‌های آنتی‌بیوگرام شامل مولر-هینتون آگار

است که به نسبت ۱/۵۰۰ رقیق شده است) به لوله‌های ۱ تا ۱۰ اضافه می‌شود. در این حالت لوله شماره ۱۰ کنترل باکتری، لوله ۱۱ کنترل محیط مولر- هیتون مایع استریل و لوله ۱۲ کنترل عصاره استریل می‌باشد. پس از انکوباسیون لوله‌ها در دمای ۳۷ °C و به مدت ۲۴ ساعت لوله دارای کمترین غلظت عصاره که رشدی نشان نداد، به‌عنوان حداقل غلظت بازدارنده انتخاب شد (۷ و ۸).

می‌گردد و به لوله دوم ۱ میلی‌لیتر محیط محیط مولر- هیتون مایع اضافه می‌شود. پس از اتوکلاو لوله‌ها مقدار ۳۰ میلی‌گرم عصاره جلبکی محلول در دی متیل سولفواکساید استریل شده به لوله‌های ۱، ۲ و ۱۲ اضافه می‌شود. سپس ۰/۵ میلی‌لیتر از لوله ۲ برداشته و به لوله ۳ منتقل می‌گردد و این کار تا لوله ۹ انجام پذیرفت و ۰/۵ میلی‌لیتر از لوله ۹ دور ریخته شد. ۰/۵ میلی‌لیتر از کشت رقیق شده در محیط مایع (کشت رقیق شده، کشت استاندارد شده با ۰/۵ مک فارلند

جدول ۱) اثرات ضدباکتریایی جلبک‌های *S.angustifolium* و *L.snyderiae*

آمی سیلین*		کلروفرمی		متانولی		کلروفرمی		متانولی		باکتری‌ها
IZ	MIC	IZ	MIC	IZ	MIC	IZ	MIC	IZ	MIC	
۱۶	۳/۲	۱۹	۳/۷۵	۱۵	۷/۵	۱۸	۳/۷۵	۱۴	۷/۵	<i>S.mutans</i>
۱۴	۶/۴	۱۲	۱۵	۱۱	۱۵	۱۳	۱۵	۱۳	۱۵	<i>S.salivaris</i>
۱۵	۳/۲	۱۴	۷/۵	۱۵	۷/۵	۱۷	۷/۵	۱۵	۷/۵	<i>S.Sanguis</i>
۱۹	۱/۶	۱۶	۷/۵	۱۹	۳/۷۵	۲۰	۳/۷۵	۱۸	۳/۷۵	<i>S.typhi</i>
۱۷	۱/۶	۱۴	۱۵	۱۲	۱۵	۱۵	۱۵	۱۴	۱۵	<i>P.vulgaris</i>
۱۳	۶/۴	۱۰	۱۵	۱۰	۱۵	۱۳	۱۵	۱۱	۱۵	<i>S.flexniu</i>
۸	۱۲/۸	—	Nt	—	Nt	۱۲	۱۵	—	Nt	<i>M.tuteus</i>

\*آنتی‌بیوتیک آمی‌سیلین با غلظت ۱۰ میکروگرم به ازای هر ریسک مورد آزمون قرار گرفت.

MIC: Minimum Inhibitory Concentration

IZ: Inhibition Zone

N: not tested

حساسیت را نسبت به عصاره‌های کلروفرمی جلبک‌های *S.angustifolium* و *L.snyderiae* با قطر هاله‌های عدم رشد به ترتیب ۱۸ و ۱۹ میلی‌متر ( $P > 0.05$ ) و حداقل غلظت بازدارنده ۳/۷۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر نشان داده است که در مقایسه با نتایج آنتی‌بیوتیک آمی‌سیلین، عصاره‌های جلبکی از تأثیر بالایی برخوردار می‌باشد. عصاره‌های متانولی جلبک‌های *L.snyderiae* و *S.angustifolium* با ایجاد هاله‌های عدم رشد به قطرهای به ترتیب ۱۴ و ۱۵ میلی‌متر ( $P > 0.05$ ) و حداقل غلظت بازدارنده ۷/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر اثرات متوسطی را روی این باکتری نشان دادند. نتایج اثرات ضدباکتریایی عصاره‌های آلی جلبک‌ها

## آنالیز داده‌ها

پس از جمع‌آوری داده‌های آلی به دست آمده شامل قطر هاله‌های عدم رشد، به منظور تجزیه و تحلیل آنها از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۱/۵ (SPSS Inc, Chicago, ) و آزمون‌های تحلیل واریانس تک عاملی (One-way ANOVA) و آزمون t استفاده شد.

## یافته‌ها

نتایج آزمون حساسیت به روش انتشار دیسک در دوز ۴ میلی‌گرم عصاره‌های آلی جلبک‌ها و آزمون حداقل غلظت بازدارنده در جدول ۱ ارائه شده است. بر اساس نتایج به دست آمده باکتری *S.mutans* بیشترین

*L. snyderiae* با قطر هاله عدم رشد ۱۲ میلی‌متر و مقدار حداقل غلظت بازدارنده ۱۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر حساسیت متوسطی نشان داد و نسبت به باقی عصاره‌های آلی هر دو گونه جلبکی مقاوم بود.

### بحث

داده‌های نتایج آزمون‌های حداقل غلظت بازدارنده برای عصاره‌های آلی هر دو گونه جلبکی از مقادیر گزارش شده برای آنتی‌بیوتیک‌های تجاری و مقادیر اندازه‌گیری شده برای آمپی‌سیلین که به‌عنوان کنترل مثبت با نتایج آزمون آنتی‌بیوگرام مورد مقایسه قرار گرفت، بسیار بیشتر بود که این مسئله با توجه به این که عصاره‌های آلی سلولی در واقع به‌صورت مخلوط پیچیده‌ای از ترکیبات شیمیایی متفاوت با اثرات مختلف بر یکدیگر هستند و با عنایت به‌اینکه احتمالاً بخش کوچکی از این ترکیبات نامشخص دارای فعالیت آنتی‌بیوتیکی می‌باشند قابل توجه است.

مقادیر زیاد نتایج آزمون‌های حداقل غلظت بازدارنده مربوط به عصاره‌های آلی جلبکی نسبت به مقادیر کم کنترل‌های مثبت آنتی‌بیوتیکی در کارهای محققین دیگر نیز مشاهده شده است (۸ و ۹).

با توجه به‌اینکه متانول از قطبیت بیشتری نسبت به کلروفرم برخوردار است اما نتایج ضدباکتریایی ضعیف‌تری نسبت به کلروفرم نشان داده است، می‌توان احتمال داد که به‌علت قطبیت بیشتر، اکثر ترکیبات و اجزا جلبکی دیگر (از جمله مقدار فراوانی کلروفیل) را همراه ماده فعال استخراج می‌کند و در نهایت در این نوع عصاره نسبت مواد فعال زیستی با خاصیت ضدباکتریایی نسبت به کل محلول استخراجی در قیاس با عصاره کلروفرمی کاهش می‌یابد. شاهد این فرضیه این است که پس از تهیه برش کلروفرمی

نسبت به باکتری *S. salivaris* تفاوت معنی‌داری نشان نداد ( $P > 0/05$ ) و حداقل غلظت بازدارنده تمامی عصاره‌ها ۱۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اندازه‌گیری شد که نسبت به مقادیر ثبت شده برای آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین ضعیف می‌باشد. در مورد باکتری *S. sanguis* نیز هاله‌های عدم رشد اندازه‌گیری شده عصاره‌های مختلف با قطرهای ۱۴، ۱۵ و ۱۷ میلی‌متر تفاوت معنی‌داری را در نتایج نشان نمی‌دهد ( $P > 0/05$ ) و مقدار حداقل غلظت بازدارنده نیز برای تمامی عصاره‌ها ۷/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر اندازه‌گیری شد که نسبت به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین دارای اثرات متوسطی می‌باشند.

باکتری *S. typhi* بیشترین حساسیت را در بین سویه‌های باکتریایی این پژوهش نسبت به عصاره‌های جلبکی از خود نشان داده است ( $P < 0/05$ ) و مقادیر حداقل غلظت بازدارنده اندازه‌گیری شده به‌غیر از عصاره کلروفرمی *S. angustifolium* که ۷/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر می‌باشد، برای باقی عصاره‌های جلبک‌ها مقدار ۳/۷۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر اندازه‌گیری شده است که در مقایسه با کنترل آنتی‌بیوتیکی دارای حساسیت بالایی می‌باشد. نتایج هاله‌های عدم رشد اندازه‌گیری شده و حداقل غلظت بازدارنده برای باکتری *P. vulgaris* در مقایسه با آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین ضعیف بود و نتایج قطر هاله‌های عدم رشد عصاره‌های جلبکی در مورد این باکتری اختلاف معنی‌داری نشان ندادند ( $P > 0/05$ ). در مورد باکتری *S. flexniu* نیز نتایج با نتایج اخذ شده در مورد باکتری *S. salivaris* مطابقت کامل داشت و اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید ( $P > 0/05$ ).

در بین سویه‌های باکتریایی این پژوهش باکتری *M. luteus* بیشترین مقاومت را از خود نشان داد ( $P < 0/05$ ) و تنها نسبت به عصاره کلروفرمی جلبک

با توجه به نتایج آزمون حساسیت ضد میکروبی به روش انتشار دیسک ( $P < 0.05$ ) و نتایج آزمون حداقل غلظت بازدارنده به دست آمده به طور کلی جلبک *Laurencia snyderiae* از اثرات ضدباکتریایی قوی تر و بهتری نسبت به جلبک *Sargassum angustifolium* برخوردار است.

### تشکر و قدردانی:

بدین وسیله از پرسنل زحمت کش پژوهشگاه میگوی کشور که با راهنمایی و همکاری خود در پیشبرد و انجام این پژوهش مؤثر بودند، تشکر و قدردانی می شود.

از عصاره متانولی نخستین، ظرف حاوی محلول آبی عصاره متانولی کاملاً به رنگ سبز روشن در می آید. با توجه به این نتایج اجزای فعال زیستی مورد نظر بایستی ترکیباتی با قطبیت کم و چربی دوست باشند. می توان حدس زد که این ترکیبات یا بخشی از این ترکیبات در جلبک *Laurencia snyderiae* احتمالاً ترکیبات چربی دوست هالوژن دار می باشند. تاکنون ترکیبات هالوژن دار متعددی شامل آلکین ها، فنول ها، سسکو ترپنوئیدها، دیترپنوئیدها، استوژنین های C15 غیر ترپنوئید و اترها از گونه های جلبکی متعلق به جنس *Laurencia* در جهان توسط محققین بسیاری گزارش شده اند که اثرات ضد میکروبی تعدادی از این ترکیبات به اثبات رسیده است (۹-۱۵).

### References:

1. Barsanti L, Gualtieri P. Algae anatomy, biochemistry and biotechnology. New York: Taylor and Francis Group, 2006.
2. Gonzalez A, Basilio A, Cabello A, et al. Screening of antimicrobial activities in red, green and brown macroalgae from Gran Canaria (Canary Islands, Spain). *Int Mic* 2001; 4: 35-40.
3. Okeke N, Laxmanarayan R, Bhutta A, et al. Antimicrobial resistance in developing countries, Part 1: recent trends and current status. *Lan Infec dis* 2005; 5: 481-93.
4. Salehi P, Sonboli A, Eftekhari F, et al. Essential oil composition, antibacterial and antioxidant activity of the oil and various extracts of *Ziziphora clinopodioides* subs. *rigida* (BOISS.) RECH. F. from Iran. *Bio Pharm Bul* 2005; 28: 1892-6.
5. Cos P, Vlietinck A, Berghe D, et al. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro proof of concept. *J of Ethno* 2006; 106: 290-302.
6. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 11th informational supplement. Pennsylvania: (NCCLS) 2001; 21.
7. Baron EJ, Peterson LR, Finegold SM. Bailey and Scott's diagnostic microbiology. 9th ed. Chicago: Mosby, 1994.
8. Nariman F, Mobasheri F, Sohrabi Pur J. Antibacterial activities of four red and brown algae extracts from Hormozgan coasts. *J Sci Azahra Uni* 1385; 2: 55-66.
9. Bansemir A, Blume M, Schroder S, et al. Screening of cultivated seaweeds for antibacterial activity against fish pathogenic bacteria. *Aqua* 2005; 252: 79-84.
10. Erickson K, Beutler J, Gray G, et al. Majapolene A, a cytotoxic peroxide, and related sesquiterpenes from the red alga *Laurencia majuscula*. *J of Nat Pro* 1995; 58: 1848-60.
11. Masuda M, Abe T, Sato S, et al. Diversity of halogenated secondary metabolites in the red alga *Laurencia nipponica* (Rhodomelaceae, Ceramiales). *J of Phyc* 1997; 33: 196-208.
12. Moore B. Biosynthesis of marine natural products: microorganisms and macroalgae. *Nat Pro Rep* 1999; 16: 653-74.
13. Carvalho R, Roque F. Halogenated and sulphated phenols from marine macroalgae. *Quimica Nova* 2000; 23: 757-65.
14. Suzuki M, Nakano S, Takahashi Y, et al. Brominated labdane-type diterpenoids from an Okinawan *Laurencia* sp. *J of Nat Pro* 2002; 65: 801-4.
15. Dembisky V, Tolstikov G, Tolstikov A. Natural halogenated non-terpenic C15-acetogenins. *Chem for Sustain Dev* 2003; 11: 329-39.