فصلنامه طبّ جنوب
پژوهشکده زیست-پزشکی خلیج فارس
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر
سال چهاردهم، شماره ۱، ۲۲- ۱۷ (بهار ۱۳۹۰)

بررسی اثرات ضدباکتریایی جلبک‌های دریایی Laurencia snyderiae و Sargassum angustifolium علیه پاتوژن‌های انسانی

بهروز درخشش[1*]، مرتضی یوسف‌زادی[2]، محمد افشارنسب[3]، وحید یگانه[4]، عقیل دشتیان‌نسب[4]

[1] گروه زیست فناوری، مرکز مطالعات و پژوهش‌های خلیج فارس، دانشگاه خلیج فارس
[2] گروه گیاهان دارویی، پژوهشکده علوم پایه کاربردی جهاد دانشگاهی، دانشگاه شهید بهشتی
[3] بخش بهداشت و بیماری‌های آبزیان، مؤسسه تحقیقات شیلات ایران
[4] 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 ضدمیکروبی جدید که به‌طور طبیعی تولید می‌شوند، برای دستیابی به‌منابع 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 اسینیدریا و«سارگاسوم انگوسیتینیوم» جمع‌آوری شده از سواحل بندر بوشهر روی ۳ سویه باکتریایی گرم مثبت به نام‌های «استوپتوکوکوس موتانس»، «استوپتوکوکوس سالیواریس»، «استوپتوکوکوس سانگویسس»، و ۴ سویه باکتریایی گرم منفی به نام‌های «سالمونلاتیفی»، «پروتئوس وولگاریس»، «شیگلا 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 وسیله‌ی 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 مقاوت 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 خلیج‌فارس، مرکز مطالعات و پژوهش‌های خلیج فارس

E-mail:behruzdrakhshesh@yahoo.com

مقدمه

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 ضدمیکروبی 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 Streptococous mutans، Streptococous salivaris، Streptococous sanguis، Salmonela typhi، Proteus vulgaris، Shigella flexniu و Micrococos luteus مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌کار

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 ($CHCl_3$) 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

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 پتریدیش‌های دیش‌های تمیز منتقل و در زیر هود لامینار خشک شدند. عصاره‌های متانولی خشک در ۳۰۰ میلی‌لیتر آب حل و با کلروفرم (۱۰۰×۳ میلی‌لیتر) استخراج گردیدند، بدین ترتیب برش کلروفرمی 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 ضدمیکروبی

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

برای بررسی اثرات ضدباکتریایی از آزمون حساسیت ضدمیکروبی (آنتی‌بیوگرام) به‌روش اصلاح شده انتشار دیسک (Agar disk diffusion) و آزمون کمّی حداقل غلظت بازدارنده به‌روش رقت‌های متوالی لوله (Serial tubes dilutions) استفاده گردید. سوسپانسیون‌های باکتریایی مورد استفاده در آزمون‌های آنتی بیوگرام 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 (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 ۰/۲(w/v) 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

می‌گردد و به لوله دوم ۱ میلی‌لیتر محیط محیط مولر- هینتون 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 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- هینتون مایع استریل و لوله ۱۲ کنترل عصاره استریل می‌باشد. پس از انکوباسیون لوله‌ها در دمای ۳۷ °c و به‌مدت ۲۴ ساعت لوله دارای کمترین غلظت عصاره که رشدی نشان نداد، به‌عنوان حداقل غلظت بازدارنده انتخاب شد (۷ و ۸).

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

باکتری‌ها	متانولی		کلروفرمی		متانولی		کلروفرمی		آمپی‌سیلین*	
	L.snyderiae		L.snyderiae		S.angustifolium		S.angustifolium			
	MIC	IZ	MIC	IZ	MIC	IZ	MIC	IZ	MIC	IZ
S.mutans	۷/۵	۱۴	۳/۷۵	۱۸	۷/۵	۱۵	۳/۷۵	۱۹	۳/۲	۱۶
S.salivaris	۱۵	۱۳	۱۵	۱۳	۱۵	۱۱	۱۵	۱۲	۶/۴	۱۴
S.Sanguis	۷/۵	۱۵	۷/۵	۱۷	۷/۵	۱۵	۷/۵	۱۴	۳/۲	۱۵
S.typhi	۳/۷۵	۱۸	۳/۷۵	۲۰	۳/۷۵	۱۹	۷/۵	۱۶	۱/۶	۱۹
P.vulgaris	۱۵	۱۴	۱۵	۱۵	۱۵	۱۲	۱۵	۱۴	۱/۶	۱۷
S.flexniu	۱۵	۱۱	۱۵	۱۳	۱۵	۱۰	۱۵	۱۰	۶/۴	۱۳
M.tuteus	Nt	__	۱۵	۱۲	Nt	__	Nt	__	۱۲/۸	۸

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

MIC: Minimum Inhibitory Concentration
IZ: Inhibition Zone
N: not tested

آنالیز داده‌ها

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

یافته‌ها

نتایج آزمون حساسیت به‌روش انتشار دیسک در دوز ۴ میلی‌گرم عصاره‌های آلی جلبک‌ها و آزمون حداقل غلظت بازدارنده در جدول ۱ ارائه شده است.

بر اساس نتایج به‌دست آمده باکتری S.mutans بیشترین حساسیت را نسبت به عصاره‌های کلروفرمی جلبک‌های L.snyderiae و S.angustifolium با قطر هاله‌های عدم رشد به‌ترتیب ۱۸ و ۱۹ میلی‌متر (P>۰/۰۵) و حداقل غلظت بازدارنده ۳/۷۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر نشان داده است که در مقایسه با نتایج آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین، عصاره‌های جلبکی از تأثیر بالایی برخوردار می‌باشد. عصاره‌های متانولی جلبک‌های L.snyderiae وS.angustifolium با ایجاد هاله‌های عدم رشد به قطرهای به‌ترتیب ۱۴ و ۱۵ میلی‌متر (P>۰/۰۵) و حداقل غلظت بازدارنده ۷/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر اثرات متوسطی را روی این باکتری نشان دادند.

نتایج اثرات ضدباکتریایی عصاره‌های آلی جلبک‌ها

نسبت به باکتری S.salivaris تفاوت معنی‌داری نشان نداد (P>۰/۰۵) 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 قطرهای۱۴، ۱۵ و ۱۷ میلی‌متر تفاوت معنی‌داری را در نتایج نشان نمی‌دهد (P>۰/۰۵) 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<۰/۰۵) و مقادیر حداقل غلظت بازدارنده اندازه‌گیری شده به‌غیر از عصاره کلروفرمیS.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>۰/۰۵). 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>۰/۰۵).

در بین سویه‌های باکتریایی این پژوهش باکتری M.luteus بیشترین مقاومت را از خود نشان داد (P<۰/۰۵) وتنها نسبت به‌عصاره کلروفرمی جلبک 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 آنتی بیوتیک‌های 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 توجیه 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 به‌کل محلول استخراجی در قیاس با عصاره کلروفرمی کاهش می‌یابد. شاهد این فرضیه این است که پس از تهیه برش کلروفرمی

از عصاره متانولی نخستین، ظرف حاوی محلول آبی عصاره متانولی کاملاً به رنگ سبز روشن در می‌آید.
با توجه به این نتایج اجزای فعال زیستی مورد نظر بایستی ترکیباتی با قطبیت کم و چربی دوست باشند. می‌توان حدس زد که این ترکیبات یا بخشی از این ترکیبات در جلبک Laurencia snyderiae احتمالاً ترکیبات چربی دوست هالوژن‌دار می‌باشند. تاکنون ترکیبات هالوژن‌دار متعددی شامل آلکین‌ها، فنول‌ها، سسکوترپنوئیدها، دیترپنوئیدها، استوژنین‌های C15 غیرترپنوئید و اترها از گونه‌های جلبکی متعلق به جنس Laurencia در جهان توسط محققین بسیاری گزارش شده‌اند که اثرات ضدمیکروبی تعدادی از این ترکیبات به اثبات رسیده است (۱۵-۹).

با توجه به‌نتایج آزمون حساسیت ضدمیکروبی به روش انتشار دیسک (P<۰/۰۵) و نتایج آزمون حداقل غلظت بازدارنده به‌دست آمده به‌طور کلی جلبک Laurencia snyderiae از اثرات ضدباکتریایی قوی‌تر و بهتری نسبت به جلبک Sargassum angustifolium برخوردار است.

تشکر و قدردانی:

بدین‌وسیله از پرسنل زحمت‌کش پژوهشکده میگوی کشور که با راهنمایی و همکاری خود در پیشبرد و انجام این پژوهش مؤثر بودند، تشکر و قدردانی می‌شود.

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 Gram Canaria (Canary Islands, Spain). Int Mic 2001; 4: 35-40.
3.Okeke N, Laxmaninarayan 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, Eftekhar 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. MajapoleneA, a cytotoxic peroxide, and related sesquiterpenes from the red alga Laurencia majuscule. 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.