

Investigating the Antimicrobial Activity of Bacteria associated with the Marine sponge *Haliclona* sp. collected from the Persian Gulf

Nehleh Nasiri¹, Mohammad Reza Taherizadeh^{1*}, Mohsen Gozari²

¹Department of Marine Biology, Faculty of Marine Science and Technology, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran
²Persian Gulf and Sea of Oman Ecology Research Institute, Fisheries Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Bandar Abbas, Iran

Received: 18 July 2022 Accepted: 6 September 2022

Abstract

Background and Aim: To overcome the crisis of antibiotic resistance, the development of more effective antibiotics without side effects is an urgent need. Meanwhile, the bacteria associated with sea sponges have a good potential for discovering new antimicrobial compounds with a large variety of secondary metabolites. The present study was conducted with the aim of determining the antimicrobial activity of bacteria associated with the marine sponge *Haliclona* sp. collected from the Persian Gulf.

Methods: In the present study, the antimicrobial effects of bacteria associated with the marine sponge *Haliclona* sp. collected from Lark and Kish islands in the Persian Gulf, were studied against Gram-positive bacterium *Micrococcus luteus*. After identifying and separating the samples, purification of sponge-related bacteria was done. Isolation and purification were done on culture media including Starch caseinnitrate agar, Marine zobell agar, Glycerol asparagine agar, Marinsponge agar. Then, in order to screen the biological activities of the purified bacteria, a nutrient broth culture medium was used. Finally, the antimicrobial activity of the isolated bacteria was measured using the well diffusion method against the gram-positive bacterium *Micrococcus luteus*.

Results: The highest amount of bacteria associated with the sponge *Haliclona* sp. related to MSA, SCNA, MZA, and GAA culture media with the isolation of CFUg-1, were 5.88 ± 0.05 , 4.87 ± 0.05 , 4.20 ± 0.03 and 2.75 ± 0.23 related to sponges collected from Lark Island and 6.15 ± 0.07 , 5.08 ± 0.05 , 4.90 ± 0.07 and 4.19 ± 0.19 related to the sponges collected from the Kish island, respectively. As a result of purification, nearly 121 bacterial strains were purified, of which 12 purified bacterial strains had antibacterial activity.

Conclusion: The current findings demonstrated that the marine sponge *Haliclona* sp. has significant antibacterial effects; as a result, this marine sponge is a suitable candidate in future studies for the isolation of effective antibacterial compounds.

Keywords: Marine Sponge, Antimicrobial, Persian Gulf, *Haliclona* sp.

*Corresponding author: Mohammad Reza Taherizadeh. Email: taheri.1965@gmail.com

Address: Department of Marine Biology, Faculty of Marine Science and Technology, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran.

بررسی فعالیت ضد میکروبی باکتری‌های مرتبط با اسفنج دریایی *Haliclona sp* جمع‌آوری شده از خلیج فارس

نحله نصیری^۱، محمدرضا طاهری زاده^{۱*}، محسن گذری^۲

^۱ گروه زیست شناسی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران
^۲ پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان، موسسه تحقیقاتی شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بندرعباس، ایران

دریافت مقاله: ۱۴۰۱/۰۴/۲۷ پذیرش مقاله: ۱۴۰۱/۰۶/۱۵

چکیده

زمینه و هدف: برای غلبه بر بحران مقاومت آنتی‌بیوتیکی، توسعه آنتی‌بیوتیک‌های موثرتر و بدون عوارض جانبی یک نیاز فوری است. این در حالی است که باکتری‌های مرتبط با اسفنج‌های دریایی با دارا بودن تنوع زیادی از متابولیت‌های ثانویه، پتانسیل مناسبی برای کشف ترکیبات ضد میکروبی جدید دارند. مطالعه حاضر با هدف تعیین فعالیت ضد میکروبی باکتری‌های مرتبط با اسفنج دریایی *Haliclona sp* جمع‌آوری شده از خلیج فارس انجام شد.

روش‌ها: در مطالعه حاضر، اثرات ضد میکروبی باکتری‌های مرتبط با اسفنج دریایی *Haliclona sp* جمع‌آوری شده از جزایر لارک و کیش در خلیج فارس، علیه باکتری گرم مثبت *Micrococcus luteus* مورد مطالعه قرار گرفت. بعد از شناسایی و جداسازی نمونه‌ها، خالص‌سازی باکتری‌های مرتبط با اسفنج انجام شد. جداسازی و خالص‌سازی بر روی محیط‌های کشت شامل Starch caseinnitrate agar، Marine zobell agar، Glycerol asparagine agar، Marinesponge agar انجام گرفت. سپس به منظور غربالگری فعالیت‌های زیستی باکتری‌های خالص‌سازی شده، از محیط کشت نوترینت برات استفاده گردید. در نهایت فعالیت ضد میکروبی باکتری‌های جداسازی شده با استفاده از روش انتشار از چاهک، در مقابل باکتری گرم مثبت *Micrococcus luteus* مورد سنجش قرار گرفت.

یافته‌ها: بیشترین میزان باکتری مرتبط با اسفنج دریایی *Haliclona sp* به ترتیب مربوط به محیط‌های کشت MZA، SCNA، MSA و GAA با جداسازی CFUg-1 $5/88 \pm 0/05$ ، $4/87 \pm 0/05$ ، $4/20 \pm 0/03$ و $2/75 \pm 0/23$ مربوط به اسفنج‌های جمع‌آوری شده از جزیره لارک و جداسازی CFUg-1 $6/15 \pm 0/07$ ، $5/08 \pm 0/05$ ، $4/90 \pm 0/07$ و $4/19 \pm 0/19$ مربوط به اسفنج‌های جمع‌آوری شده از جزیره کیش می‌باشد. در نتیجه خالص‌سازی نزدیک به ۱۲۱ سویه باکتری تخلیص شد که ۱۲ سویه باکتری خالص‌سازی شده دارای فعالیت ضد باکتریایی بودند.

نتیجه‌گیری: یافته‌های حاضر نشان داد که اسفنج دریایی *Haliclona sp* دارای اثرات ضد باکتریایی قابل ملاحظه‌ای است؛ در نتیجه این اسفنج دریایی کاندیدای مناسبی در مطالعات آینده برای جداسازی ترکیبات موثر ضد باکتری می‌باشد.

کلیدواژه‌ها: اسفنج دریایی، ضد میکروبی، خلیج فارس، *Haliclona sp*.

*نویسنده مسئول: محمدرضا طاهری زاده. پست الکترونیک: taheri.1965@gmail.com

آدرس: گروه زیست شناسی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران.

مقدمه

افزایش مقاومت باکتری‌های بیماری‌زا به آنتی‌بیوتیک‌های موجود، به یک مشکل بهداشت عمومی تبدیل شده است و برای غلبه بر آن، تلاش‌های تحقیقاتی در جهت کشف ترکیبات ضدباکتریایی در حال انجام است (۱). استفاده گسترده از آنتی‌بیوتیک‌ها در محیط‌های بیمارستانی و عملیات کشاورزی همراه با تعداد بالای باکتری‌های بیماری‌زا موجود در این محیط‌ها، فشارهای انتخابی قدرتمندی را برای سویه‌های باکتریایی مقاوم به آنتی‌بیوتیک ایجاد کرده است (۲). در این زمینه، منابع غیرمعمول، مانند میکروارگانیسم‌های محیط‌های دریایی، توجه دانشمندان را به خود جلب کرده‌اند. محیط دریایی منبع فراوانی از ترکیبات طبیعی فعال با خواص بیولوژیکی و دارویی است (۳). اسفنج‌ها (شاخه پوریفر) از نظر تکاملی موجوداتی باستانی، چندسلولی و بدون تحرک هستند که در بسیاری از محیط‌های اعماق دریا، به ویژه سواحل سنگی و صخره‌های مرجانی زندگی می‌کنند. آنها منبعی غنی از محصولات ثانویه بیوتکنولوژیک بوده که دارای محصولات طبیعی پیچیده با خواص ضدویروسی، ضدتوموری، ضد میکروبی یا سیتوتوکسیک می‌باشند (۴). اقیانوس حامل میکروب‌های بسیاری است که بیشتر آنها به موجودات دریایی دیگر متصل هستند (۵).

اسفنج‌ها میزبان جامعه بزرگی از میکروارگانیسم‌ها، از جمله باکتری‌های مختلف، قارچ‌ها، جلبک‌های تک سلولی و باستانی هستند (۶). زیست توده میکروب‌ها در برخی از اسفنج‌ها می‌تواند تا ۴۰ تا ۶۰ درصد از کل زیست توده میزبان را تشکیل دهد (۷). هر سال، مقدار ترکیبات فعال متابولیکی ناشی از محیط دریایی افزایش می‌یابد و اسفنج‌ها سهم زیادی با حدود ۲۰۰ ترکیب فعال در این زمینه دارند که در آن ماهیت ترکیبات فعال بسته به گونه‌های اسفنجی متفاوت است (۸). اسفنج‌ها مکان ایده‌آلی برای رشد باکتری‌ها فراهم می‌کنند، زیرا تغذیه ثابت با فیلتر جریان مداوم آب دریا را فراهم می‌نماید و مواد زائد دفع شده توسط اسفنج می‌تواند منبع غذایی باشد (۹). اسفنج یکی از موجودات دریایی است که معمولاً با میکروارگانیسم‌ها همراه است. این میکروارگانیسم‌ها منابع طبیعی بالقوه برای صنعت داروسازی هستند. اسفنج خود بزرگترین منبع ترکیبات زیست فعال است (۱). آنها دومین جامعه بزرگ اعماق دریا در مقایسه با صخره‌های مرجانی هستند، و تنوع گونه‌های اسفنجی از تنوع گونه‌های ترکیبی موجودات دیگر در جامعه بیشتر است (۴). نشان داده شده است که باکتری‌های دریایی می‌توانند تا ۴۰ درصد از کل زیست توده اسفنج‌ها را تشکیل دهند (۲).

برخی از متابولیت‌های مشتق شده از اسفنج شباهت قابل توجهی به متابولیت‌های میکروبی شناخته شده نشان می‌دهند و این فرضیه وجود دارد که بسیاری از محصولات طبیعی از بی‌مهرگان دریایی ممکن است منشأ میکروبی داشته باشند، که

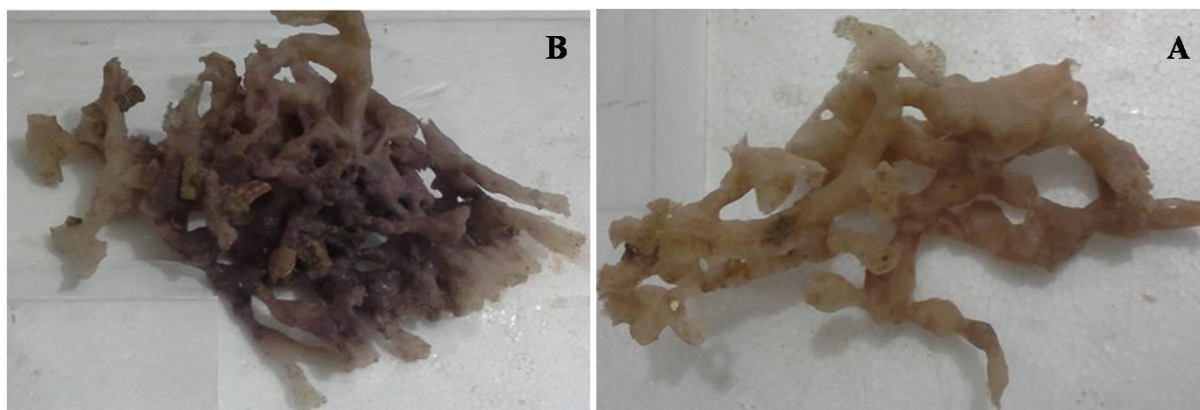
احتمال استفاده از باکتری‌های مرتبط با اسفنج را به جای خود اسفنج نشان می‌دهد (۱۰). شباهت‌های ساختاری مشاهده شده بین ترکیبات فعال اسفنج‌های دریایی و میکروارگانیسم‌های زمینی نشان داده که باکتری‌های مرتبط با اسفنج می‌توانند منابع اصلی برخی از این ترکیبات فعال باشند (۱۱، ۱۲). علاوه بر این، مطالعات متعدد طیف وسیعی از فعالیت‌های ضد میکروبی را از میکروب‌های مرتبط با اسفنج شناسایی کرده‌اند که این جمعیت‌های میکروبی را به منبع مهمی برای ضد میکروبی‌ها جدید تبدیل می‌کند (۲). بنابراین، باکتری‌ها یا میکروارگانیسم‌هایی که با اسفنج مرتبط هستند به احتمال زیاد دارای ترکیبات زیست فعالی هستند که شبیه به بستری هستند که زندگی و تولید می‌کنند (۱). غربالگری‌های مختلف نشان داده که اسفنج‌های دریایی دارای فعالیت ضد میکروبی امیدوارکننده‌ای هستند (۱۳). مطالعات قبلی گزارش داده‌اند که بیش از ۱۵۰۰۰ ترکیب طبیعی از بی‌مهرگان دریایی به ویژه ترکیبات فعال زیستی و آنتی‌بیوتیک‌ها از اسفنج‌ها جدا شده است (۱۴).

اسفنج *Haliclona sp.* دارای فعالیت‌های مختلفی شامل ضدباکتریایی، آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی و ضدسرطانی است (۱). اسفنج‌های *Haliclona* دارای پراکنش جهانی هستند و در تمام اعماق آنها یافت می‌شوند، اما بیشتر تمایل دارند در زیستگاه‌های جزر و مدی کم عمق‌تر دیده شوند (۶). این اسفنج‌ها مکان مناسبی برای رشد باکتری‌ها فراهم می‌کنند، زیرا تغذیه ثابت فیلتر جریان مداوم آب دریا را فراهم می‌کند و مواد زائد دفع شده توسط اسفنج می‌تواند منبع غذایی باشد (۱۰). نشان داده شده که باکتری‌های دریایی می‌توانند تا ۴۰ درصد از کل زیست توده اسفنج‌ها را تشکیل دهند (۸). اسفنج‌های دریایی متعلق به جنس *Haliclona* موضوع مطالعات شیمیایی گسترده‌ای بوده‌اند (۲). تحقیقات اخیر بر روی گونه‌های *Haliclona* منجر به جداسازی انواع متابولیت‌های ثانویه فعال زیستی از جمله آلکالوئیدها، ماکرولیدها، پلی‌استرین‌ها، پلی‌کتیدها، استروئیدها، پپتیدها و مشتقات هالوژنه شده است (۱۵). با توجه به پتانسیل ضد میکروبی اسفنج *Haliclona sp.* اهمیت کشف ترکیبات ضد میکروبی جدید که کاربرد دارویی دارند، در پژوهش حاضر فعالیت ضد میکروبی این اسفنج جمع‌آوری شده از جزایر لارک و کیش مورد بررسی قرار گرفت.

روش‌ها

نمونه‌برداری

در مطالعه تجربی حاضر، نمونه‌برداری اسفنج‌ها از دو جزیره لارک و کیش در خلیج فارس در پاییز ۱۳۹۹ انجام شد. تعداد ۱۰ نمونه اسفنج از عمق حدود ۱۵-۱۰ متری جزیره لارک (شکل A-۱) و تعداد ۱۲ نمونه از عمق ۱۵-۲۰ متری جزیره کیش (شکل B-۱) با غواصی جمع‌آوری شدند. نمونه‌ها به بطری‌های استریل منتقل و در زنجیره سرد به آزمایشگاه منتقل شدند.



شکل-۱. اسفنج‌های *Haliclona* sp. جمع‌آوری شده (A) جزیره لارک و (B) جزیره کیش

شده با استفاده از روش انتشار از چاهک در مقابل باکتری گرم مثبت *Micrococcus luteus* مورد سنجش قرار گرفت (۴).

نتایج

مطالعه تجربی حاضر با هدف تعیین اثر ضد میکروبی باکتری‌های مرتبط با اسفنج‌های *Haliclona* sp. جمع‌آوری شده از جزایر لارک و کیش انجام شد. نتایج جداسازی باکتری‌ها در محیط‌های کشت مختلف نشان داد محیط‌های کشت MSA، SCNA، MZA و GAA به ترتیب با جداسازی CFUg-1 $5/88 \pm 0/05$ ، $4/20 \pm 0/04$ ، $3/87 \pm 0/05$ و $2/75 \pm 0/23$ بیشترین میزان باکتری را از اسفنج‌های نمونه‌برداری شده از جزیره لارک جداسازی نمودند (شکل-۲A). این نتایج در مورد اسفنج‌های جمع‌آوری شده از جزیره کیش نشان داد بیشترین میزان باکتری‌ها به ترتیب توسط محیط‌های کشت MSA، SCNA، MZA و GAA به میزان به ترتیب CFUg-1 $6/15 \pm 0/07$ ، $5/08 \pm 0/05$ ، $4/90 \pm 0/07$ و $4/19 \pm 0/19$ جداسازی گردیدند (شکل-۲B).

نتایج غربالگری فعالیت ضد میکروبی متابولیت‌های استخراج شده نشان داد؛ ۱۲ سویه باکتری خالص‌سازی شده دارای فعالیت ضد باکتریایی بودند (شکل-۴ و جدول-۱). نتایج ارزیابی فعالیت ضد میکروبی سویه‌های باکتری در مقابل *M. luteus* نشان داد که بیشترین قطر هاله ممانعت از رشد مربوط به سویه‌های HK24 و HL36 به ترتیب به میزان $26/66 \pm 1/15$ و $21/16 \pm 0/57$ میلی‌متر و کمترین قطر هاله ممانعت از رشد مربوط به سویه‌های HK81 و HL77 به ترتیب به میزان $12/16 \pm 1/15$ و $10/66 \pm 0/15$ میلی‌متر بودند (جدول-۱).

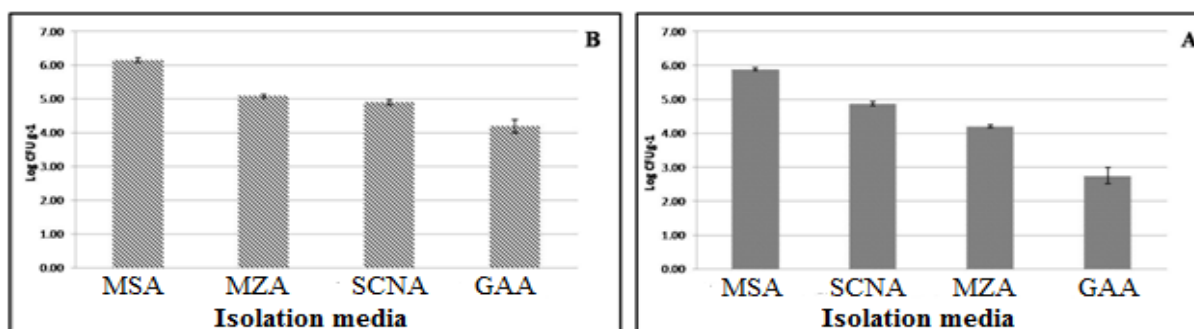
خالص‌سازی باکتری‌های جداسازی شده با استفاده از تکنیک کشت متوالی و بررسی خلوص با استفاده از مشاهدات ماکروسکوپی و میکروسکوپی انجام شد (شکل-۳). در نتیجه این فرایند، حدود ۱۲۱ سویه باکتری خالص‌سازی گردید.

شناسایی، جداسازی و خالص‌سازی باکتری‌های مرتبط با اسفنج *Haliclona* sp.

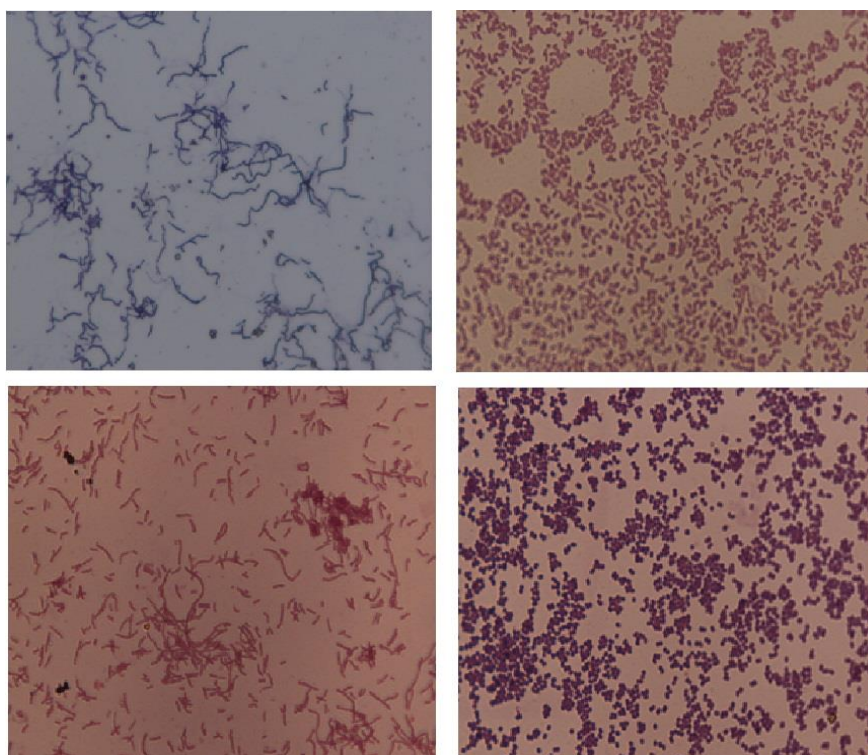
پس از انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه، شناسایی اسفنج‌ها در سطح جنس بر اساس ویژگی‌های مورفولوژیکی بر اساس کلید شناسایی Hooper (۲۰۰۳) انجام شد. نمونه‌های متعلق به جنس *Haliclona* sp. انتخاب و مورد آزمون قرار گرفتند. نمونه‌های جمع‌آوری شده پس از شستشو با آب استریل در شرایط آسپتیک به قطعات ۱ سانتی‌متری بریده شدند. پس از هموژن شدن نمونه‌ها، رقیق‌سازی متوالی انجام شد. رقت‌های تهیه شده روی محیط‌های کشت جداسازی شامل Starch caseinnitrate agar (SCNA)، Marine zobell agar (MZA)، Glycerol asparagine agar (GAA)، Marinesponge agar (MSA) تلقیح شده و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد تا ۴ هفته انکوبه شدند (۱۵). خالص‌سازی باکتری‌های جداسازی شده با استفاده از تکنیک کشت متوالی و بررسی خلوص با استفاده از مشاهدات میکروسکوپی و ماکروسکوپی انجام شد. نمونه‌های خالص شده تا انجام آزمون‌های غربالگری بصورت تلقیح شده در گلیسرول ۲۰ درصد در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند.

تولید متابولیت‌های ثانویه و غربالگری فعالیت ضد میکروبی متابولیت‌های استخراج شده

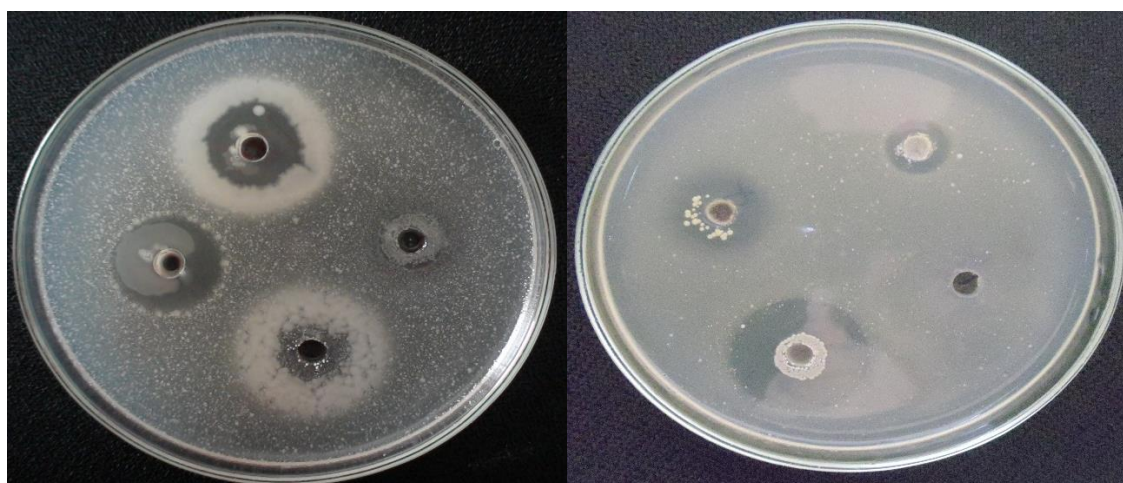
به منظور غربالگری فعالیت‌های زیستی باکتری‌های خالص‌سازی شده، سوسپانسیون سویه‌های منتخب با تراکم 10^5 CFU/ml تهیه و در محیط کشت نوترینت براث تلقیح شد. پس از انکوباسیون در دمای 28°C در مدت متناسب (۲ روز برای باکتری‌های سریع‌الرشد و تا ۷ روز برای باکتری‌های کند رشد) مایع تخمیری حاصله برداشت شده و با استفاده از پمپ خلاء فیلتر گردید. مایع تخمیری بدست آمده در آزمون‌های زیست‌سنجی مورد استفاده قرار گرفت. فعالیت ضد میکروبی باکتری‌های جداسازی



شکل-۲. جداسازی باکتری‌ها از اسفنج‌های *Haliclona sp.* در محیط‌های کشت مختلف (A) جزیره لارک و (B) جزیره کیش.



شکل-۳. تصاویر میکروسکوپی از برخی باکتری‌های غالب جداسازی شده



شکل-۴. نمایی از فعالیت ضدباکتریایی باکتری‌های مرتبط با اسفنج *Haliclona sp.*

جدول-۱. ارزیابی فعالیت ضد میکروبی سویه های باکتری در مقابل *M.luteus*

نام سویه	قطر هاله ممانعت از رشد (mm)	نام سویه	قطر هاله ممانعت از رشد (mm)
HL15	۲۰/۱۶±۰/۵۷	HL 81	۱۲/۱۶±۱/۱۵
HL 23	۱۵/۶۶±۰/۵۷	HL 85	۱۸/۳۳±۰/۵۷
HL 24	۲۶/۶۶±۱/۱۵	HK 5	۲۵
HL 31	۱۴/۶۶±۰/۵۷	HK 14	۱۴/۱۶±۰/۵۷
HL 56	۱۵±۰	HK 36	۲۱/۱۶±۰/۵۷
HL77	۱۰/۶۶±۰/۱۵	HK 41	۱۶/۶۶±۱/۱۵

فعالیت ضد میکروبی مربوط به سویه های HL 56، HK 5 و HL 24 با کمترین قطر هاله ممانعت از رشد به ترتیب به میزان 0 ± 15 ، 0 ± 20 و 0 ± 21 میلی متر بودند. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که اسفنج *Haliclona sp.* دارای فعالیت ضد میکروبی علیه باکتری گرم مثبت *Micrococcus luteus* است.

Nursyam و همکاران نشان دادند که اسفنج *Haliclona sp.* قادر به مهار رشد *Staphylococcus aureus* با قطر ناحیه مهار $12/9$ میلی متر بود (۱). Hoppers و همکاران گزارش کردند که اسفنج *Haliclona sp.* جمع آوری شده از آبهای معتدل کارولینای شمالی دارای فعالیت ضد میکروبی بوده که به دلیل بیش از یک ترکیب است (۲). کریمپور و همکاران به بررسی خواص ضد میکروبی اسفنج *H. caerulea* جمع آوری شده از جزیره لارک پرداختند. نتایج آنها نشان داد که عصاره متانولی بیشترین اثر ضدباکتریایی را به ویژه بر باکتری های گرم مثبت باسیلوس سوبتیلیس با غلظت $2/5$ mg/ml و استافیلوکوکوس اورئوس با غلظت 5 mg/ml داشتند. عصاره دی اتیل اتری بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانی را در غلظت 5 mg/ml نشان داد و نتیجه گیری شد که عصاره متانولی *H. caerulea* خاصیت ضد باکتریایی بیشتری دارد و عصاره دی اتیل اتری این اسفنج دارای اثر آنتی اکسیدانی بالاتری است (۲۲).

Hoppers و همکاران طی مطالعه ای در بررسی فعالیت ضد میکروبی *Haliclona sp.* گزارش کردند که عصاره خام از این اسفنج در آزمایش های انتشار دیسک در برابر همه باکتری های گرم منفی و گرم مثبت فعالیت داشته است، اگرچه میزان مهار در برابر بیشتر سویه ها کم بود (۲). به طور مشابه، عصاره متانولی در برابر ۶ باکتری از ۷ باکتری آزمایش شده فعال بود، در حالی که عصاره هگزان بازدارنده نبود، که این نشان می دهد که ترکیبات در طبیعت قطبی تر هستند. بسیاری از تحقیقات دیگر در مورد فعالیت ضدباکتریایی عصاره های اسفنج های دریایی، مهار بیشتری از رشد باکتری های گرم مثبت را در مقایسه با باکتری های گرم منفی نشان می دهند (۲۳، ۲۵). یافته های این پژوهش با محققانی مانند ناظمی و همکاران و Hoppers و همکاران که ذکر کردند باکتری های گرم مثبت به عصاره های اسفنج حساس هستند همخوانی داشت (۲، ۲۴). ناظمی و همکاران طی مطالعه خود بر روی ارزیابی فعالیت

بحث

بسیاری از محققان بر این باورند که میکروب های همزیست بی مهرگان دریایی منبع دست نخورده ای از ترکیبات فعال زیستی هستند (۷). تنها بخش کوچکی از این ترکیبات شناسایی و مطالعه شده اند. خلیج فارس با توجه به مجموعه بی نظیری از اکوسیستم های دریایی گرمسیری با موجودات دریایی متنوع از جمله اسفنج ها، در گروه تنوع زیستی بالا دسته بندی می شود (۱۶). اسفنج ها یکی از این موجوداتی هستند که توانایی تولید ترکیبات طبیعی را دارند اما اطلاعات کافی در مورد فعالیت های زیستی آنها در دسترس نیست. مقاومت ضد میکروبی امکان پیشگیری و درمان بیماری های عفونی ناشی از ویروس ها، باکتری ها، انگل ها و قارچ ها را کاهش می دهد. بنابراین، تلاش های روزافزون در جهت کشف و بهره برداری از ترکیبات ضد میکروبی جدید به فوریت مورد نیاز است. محیط زیست دریایی از غنی ترین اکوسیستم های روی زمین با تنوع بسیار زیاد اشکال حیات می باشد. با این حال، ترکیبات زیست فعال آن تا حد زیادی ناشناخته مانده است (۱۷). از میان موجودات دریایی، اسفنج ها امیدوارکننده ترین منبع محصولات طبیعی زیست فعال در نظر گرفته می شوند و حدود ۳۰٪ از محصولات طبیعی دریایی شناخته شده را تشکیل می دهند (۱۸). موجودات یوکاریوتی و ویروس ها عمده متنی بر تولید طیف متنوعی از محصولات متابولیت ثانویه هستند که امکان حفاظت شیمیایی کارآمد را فراهم می کند (۱۹). شواهد فزاینده نشان داده است که بسیاری از ترکیبات زیست فعال، از جمله ترکیبات ضد میکروبی، از اسفنج ها توسط همزیست های میکروبی آنها تولید می شوند (۱۰، ۱۷، ۲۰، ۲۱). در این راستا پژوهش حاضر با هدف تعیین فعالیت ضد میکروبی اسفنج دریایی *Haliclona sp.* از جزایر لارک و کیش انجام شد. در نتیجه این مطالعه، حدود ۱۲۱ سویه باکتری خالص سازی گردید. نتایج غربالگری فعالیت ضد میکروبی متابولیت های استخراج شده نشان داد ۱۲ سویه باکتری خالص سازی شده دارای فعالیت ضدباکتریایی بودند (جدول-۱). سویه های با بیشترین فعالیت ضد میکروبی در معرض جداسازی و خالص سازی ترکیبات ضد میکروبی قرار گرفتند. سویه های HK 41 و HL 81 با بیشترین قطر هاله ممانعت از رشد به ترتیب به میزان $1/15 \pm 12/16$ و $1/15 \pm 16/66$ میلی متر بیشترین فعالیت ضد میکروبی را از خود نشان دادند و کمترین

میزبان برخی از میکروب‌هایی است که ممکن است در تولید آنتی‌بیوتیک دخیل باشند. برای جداسازی ترکیبات آنتی‌بیوتیکی و روشن ساختن ساختار آنها باید کارهای بیشتری انجام شود. در مرحله بعد، شناسایی ارگانسیم تولیدکننده آنتی‌بیوتیک (میزبان یا میکروب) می‌تواند یک کار چالش برانگیز باشد. در حالی که در برخی موارد ممکن است ارگانسیم تولیدکننده کشت شود، کشت میکروب‌های همزیست معمولاً به دلیل عوامل میزبان ناشناخته که باعث رشد آنها می‌شود دشوار است (۲).

نتیجه‌گیری

یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد که باکتری‌های استخراج شده از اسفنج *Haliclona sp.* دارای فعالیت ضد میکروبی موثری هستند. لذا باکتری‌های جداسازی شده از اسفنج دریایی *Haliclona sp.* از خلیج فارس پتانسیل آن را دارد که به عنوان کاندید مناسبی در تحقیقات آینده برای جداسازی ترکیبات موثر ضدباکتریایی و برای تحقیقات بیشتر برای جداسازی ترکیبات فعال زیستی معرفی گردد.

تشکر و قدردانی: این مقاله مربوط به بخشی از پایان‌نامه دکترای دانشجو، نخله نصیری، تحت عنوان؛ ارزیابی تنوع زیستی و فعالیت‌های سیتوتوکسیک، ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی باکتری‌های مرتبط با اسفنج *Haliclona sp.* جمع‌آوری شده از خلیج فارس می‌باشد که در پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان انجام شد. بدین ترتیب از این پژوهشکده و کسانی که ما را در به ثمر رساندن این کارهای تحقیقاتی یاری کردند کمال تشکر و قدردانی را داریم.

نقش نویسندگان: نصیری: کار آزمایشگاهی، متدولوژی، آنالیز داده‌ها و نگارش مقاله. طاهری زاده: نویسنده مسئول، ایده‌پردازی، و ادیت مقاله. گذری: کار آزمایشگاهی، و ادیت مقاله. همه نویسندگان در نگارش اولیه مقاله یا بازنگری آن سهیم بوده‌اند و همه با تایید نهایی مقاله حاضر، مسئولیت دقت و صحت مندرج در آن را می‌پذیرند.

تضاد منافع: نویسندگان تصریح می‌کنند که هیچ گونه تضاد منافی در مطالعه حاضر وجود ندارد.

منابع

- Nursyam H. Antibacterial activity of metabolites products of *Vibrio alginolyticus* isolated from sponge *Haliclona sp.* against *Staphylococcus aureus*. Italian J Food Safety. 2017; 6(1). doi:10.4081/ijfs.2017.6237
- Hoppers A, Stoudenmire J, Wu S, Lopanik N. Antibiotic activity and microbial community of the temperate sponge, *Haliclona sp.* Journal of applied microbiology. 2015;118(2): 419-30.

ضدمیکروبی اسفنج دریایی *Haliclona sp.* گزارش کردند که عصاره اتیل اتری بر روی باکتری‌های گرم مثبت فعال بود. همچنین آنها بر اساس یافته‌ها، پیشنهاد کردند که *Haliclona sp.* را می‌توان به عنوان منبع آنتی‌بیوتیک و ضد قارچ جدید در نظر گرفت (۲۴). Kennedy و همکاران نشان دادند که اسفنج دریایی *H. simulans* جمع‌آوری شده از آب‌های ساحلی ایرلند، دارای فعالیت‌های ضد میکروبی در برابر پاتوژن‌های مهم سودوموناس آئروژینوزا، کلوستریدیوم دیفیسیل، استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به چند دارو و سویه‌های مخمر بیماری‌زا هستند. این مطالعه نشان داد که بخش قابل کشت باکتری از اسفنج *H. simulans* متنوع است و به نظر می‌رسد دارای پتانسیل زیادی به عنوان منبعی برای کشف عوامل فعال بیولوژیکی جدید مرتبط با پزشکی است (۲۶). Ely و همکاران گزارش کردند که اسفنج *H. cribriculis* فعالیت ضدباکتریایی قابل توجهی در برابر گونه‌های *Klebsiella* و *Vibrio cholerae* دارد (۲۷).

سنجش غربالگری ضد میکروبی باکتری‌های کشت شده در این مطالعه نشان داد که تقریباً ۱۰ درصد از سویه‌های جدا شده فعالیت ضد میکروبی دارند. طیف وسیعی از تنوع در فعالیت‌های ضد میکروبی که توسط گونه‌های اسفنجی نشان داده می‌شود ممکن است به دلیل تفاوت در غلظت و ترکیب شیمیایی در بین گونه‌ها باشد (۲۸). اسفنج‌های متعلق به جنس *Haliclona* منبع غنی از محصولات طبیعی، از جمله آمینوآلکل‌ها، دی‌آمیدهای ماکروسیکلیک، بازهای اسفنگوئیدی، آلکالوئیدها، هیدروکینون‌ها، استیلین‌ها، پپتیدهای حلقوی، استروئیدها و ترپنوئیدها هستند (۲). بنابراین با توجه به تعداد زیاد ترکیبات جدا شده از اسفنج‌های این جنس، تعجب آور نیست که دارای فعالیت ضد میکروبی باشند. Fahy و همکاران گزارش کردند که اسفنج دریایی *Haliclona sp.* حاوی ترکیبی به نام هالیکلونادایمین است که به عنوان آلکالوئید ضد میکروبی اصلی شناخته می‌شود (۲۹).

اسفنج‌ها به‌خاطر نگره‌داشتن همزیست‌های میکروبی به‌خوبی شناخته شده‌اند (۳۰، ۶). و معمولاً می‌توانند به عنوان یکی از دو نوع فراوانی میکروبی بالا و فراوانی میکروبی کم طبقه‌بندی شوند (۹). سه گونه از *Haliclona spp.* شامل اسفنج کارائیب *H. vansoesti* (۳۱)، و *H. tubifera* از خلیج مکزیک (۳۲) و *Haliclona (gellius) sp.* از بندر مونتری (۳۳) در اسفنج‌هایی با فراوانی میکروبی کم توصیف شده‌اند. به نظر می‌رسد این اسفنج

doi:10.1111/jam.12709

- Marques DN, De Almeida AS, de Oliveira Sousa AR, Pereira R, Andrade AL, Chaves RP, et al. Antibacterial activity of a new lectin isolated from the marine sponge *Chondrilla caribensis*. International J biological macromolecules. 2018; 109: 1292-301. doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.11.140
- Anteneh YS, Yang Q, Brown MH, Franco CM.

- Antimicrobial activities of marine sponge-associated bacteria. *Microorganisms*. 2021; 9(1):171. doi:10.3390/microorganisms9010171
5. Nithyanand P, Manju S, Karutha Pandian S. Phylogenetic characterization of culturable actinomycetes associated with the mucus of the coral *Acropora digitifera* from Gulf of Mannar. *FEMS Microbiology Letters*. 2011;314(2):112-8. doi:10.1111/j.1574-6968.2010.02149.x
 6. Webster NS, Taylor MW. Marine sponges and their microbial symbionts: love and other relationships. *Environmental microbiology*. 2012; 14 (2):335-46. doi:10.1111/j.1462-2920.2011.02460.x
 7. Kuo J, Yang Y-T, Lu M-C, Wong T-Y, Sung P-J, Huang Y-S. Antimicrobial activity and diversity of bacteria associated with Taiwanese marine sponge *Theonella swinhoei*. *Annals of Microbiology*. 2019; 69(3): 253-65. doi:10.1007/s13213-018-1414-3
 8. Gogineni V, Hamann MT. Marine natural product peptides with therapeutic potential: Chemistry, biosynthesis, and pharmacology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 2018; 1862(1): 81-196. doi:10.1016/j.bbagen.2017.08.014
 9. Hentschel U, Usher KM, Taylor MW. Marine sponges as microbial fermenters. *FEMS microbiology ecology*. 2006; 55(2): 167-77. doi:10.1111/j.1574-6941.2005.00046.x
 10. Santos OC, Pontes PV, Santos JF, Muricy G, Giambiagi-deMarval M, Laport MS. Isolation, characterization and phylogeny of sponge-associated bacteria with antimicrobial activities from Brazil. *Research in Microbiology*. 2010; 161(7): 604-12. doi:10.1016/j.resmic.2010.05.013
 11. Thomas TRA, Kavlekar DP, LokaBharathi PA. Marine drugs from sponge-microbe association-A review. *Marine drugs*. 2010. doi:10.3390/md8041417
 12. Wang G. Diversity and biotechnological potential of the sponge-associated microbial consortia. *J Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2006; 33(7):545. doi:10.1007/s10295-006-0123-2
 13. Nyan LK, Abas F, Ahmed M, Wei LS, Ismail IS, Shaari K. Chemical Constituents and Biological Activities of South East Asia Marine Sponges: A Review. *Pertanika J Science & Technology*. 2019.
 14. Brinkmann CM, Marker A, Kurtböke DI. An overview on marine sponge-symbiotic bacteria as unexhausted sources for natural product discovery. *Diversity*. 2017; 9(4):40. doi:10.3390/d9040040
 15. Hameş-Kocabaş EE, Ataç UZEL. Isolation strategies of marine-derived actinomycetes from sponge and sediment samples. *J microbiological methods*. 2012; 88(3): 342-349. doi:10.1016/j.mimet.2012.01.010
 16. Van Soest R, Boury-Esnault N, Vacelet J, Dohrmann M, Erpenbeck D, De Voogd N, et al. Global diversity of sponges (Porifera). *PLoS one*. 2012; 7(4):e35105. doi:10.1371/journal.pone.0035105
 17. Dat TTH, Cuc NTK, Cuong PV, Smidt H, Sipkema D. Diversity and antimicrobial activity of vietnamese sponge-associated bacteria. *Marine drugs*. 2021; 19(7):353. doi:10.3390/md19070353
 18. Carroll AR, Copp BR, Davis RA, Keyzers RA, Prinsep MR. Marine natural products. *Natural Product Reports*. 2022. doi:10.1039/D1NP00076D
 19. Helber SB, Hoeijmakers DJ, Muhando CA, Rohde S, Schupp PJ. Sponge chemical defenses are a possible mechanism for increasing sponge abundance on reefs in Zanzibar. *PLoS One*. 2018; 13 (6):413-421. doi:10.1371/journal.pone.0197617
 20. Fuerst JA. Diversity and biotechnological potential of microorganisms associated with marine sponges. *Applied microbiology and biotechnology*. 2014;98(17):31-44. doi:10.1007/s00253-014-5861-x
 21. Newman DJ, Hill RT. New drugs from marine microbes: the tide is turning. *J Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2006; 33(7): 539-44. doi:10.1007/s10295-006-0115-2
 22. Karimpoor M, Kamrani E, Yousefzadi M, Nazemi M. Antibacterial and Antioxidant Potential of *Haliclona caerulea* Extracts from Tidal Island Larak, Persian Gulf. *Modares J Biotechnology*. 2018; 9(3): 347-53.
 23. McCaffrey E, Endean R. Antimicrobial activity of tropical and subtropical sponges. *Marine Biology*. 1985; 89(1):1-8. doi:10.1007/BF00392871
 24. Nazemi M, Salimi MA, Salimi PA, Motallebi A, Jahromi ST, Ahmadzadeh O. Antifungal and antibacterial activity of *Haliclona* sp. from the Persian Gulf, Iran. *Journal de mycologie medicale*. 2014; 24 (3):220-4 doi:10.1016/j.mycmed.2014.03.005
 25. Sepčić K, Kauferstein S, Mebs D, Turk T. Biological activities of aqueous and organic extracts from tropical marine sponges. *Marine drugs*. 2010; 8(5):1550-66. doi:10.3390/md8051550
 26. Kennedy J, Baker P, Piper C, Cotter PD, Walsh M, Mooij MJ, et al. Isolation and analysis of bacteria with antimicrobial activities from the marine sponge *Haliclona simulans* collected from Irish waters. *Marine biotechnology*. 2009. doi:10.1007/s10126-008-9154-1
 27. Ely R, Supriya T, Naik C. Antimicrobial activity of marine organisms collected off the coast of South East India. *J experimental marine biology and ecology*. 2004; 309(1):121-7. doi:10.1016/j.jembe.2004.03.010
 28. Tincu JA, Taylor SW. Antimicrobial peptides from marine invertebrates. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2004; 48(10):3645-54. doi:10.1128/AAC.48.10.3645-3654.2004
 29. Fahy E, Molinski TF, Harper MK, Sullivan BW, Faulkner DJ, Parkanyi L, et al. Haliclonadamine, an antimicrobial alkaloid from the sponge *Haliclona* sp. *Tetrahedron letters*. 1988; 29(28):3427-8. doi:10.1016/0040-4039(88)85180-3
 30. Taylor MW, Hill RT, Piel J, Thacker RW, Hentschel U. Soaking it up: the complex lives of marine sponges and their microbial associates. *The ISME Journal*. 2007; 1(3):187-90. doi:10.1038/ismej.2007.32
 31. Richelle-Maurer E, Braekman J-C, Kluijver MJ, Gomez R, De Vyver G, Soest RW, et al. Cellular location of (2R, 3R, 7Z)-2-aminotetradec-7-ene-1, 3-diol, a potent antimicrobial metabolite produced by the Caribbean sponge *Haliclona vansoesti*. *Cell and tissue research*. 2001; 306(1):157-65. doi:10.1007/s004410100437
 32. Erwin PM, Olson JB, Thacker RW. Phylogenetic diversity, host-specificity and community profiling of sponge-associated bacteria in the northern Gulf of Mexico. *PloS one*. 2011; 6(11):e26806. doi:10.1371/journal.pone.0026806
 33. Sipkema D, Holmes B, Nichols SA, Blanch HW. Biological characterisation of *Haliclona gellius* sp.: sponge and associated microorganisms. *Microbial Ecology*. 2009. doi:10.1007/s00248-009-9534-8