

## جداسازی انتخابی اکتینوباکتری‌های مرتبط با اسفنج‌های خلیج فارس و ارزیابی فعالیت سیتوتوکسیک و آنتی‌اکسیدانی متابولیت‌های آنها

محسن گذری<sup>۱\*</sup>، سعید تمدنی جهرمی<sup>۲</sup>، سجاد پورمظفر<sup>۳</sup>، محمود حافظیه<sup>۴</sup>، سیامک بهزادی<sup>۵</sup>

- ۱- پژوهشگر پسادکتری، پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بندرعباس، ایران، پست الکترونیکی: [M\\_gozari@yahoo.com](mailto:M_gozari@yahoo.com)
- ۲- استادیار پژوهشی، پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بندرعباس، ایران، پست الکترونیکی: [Stamadoni@gmail.com](mailto:Stamadoni@gmail.com)
- ۳- استادیار پژوهشی، ایستگاه تحقیقات نرمتنان خلیج فارس، پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بندرلنگه، ایران، پست الکترونیکی: [sajjad5550@gmail.com](mailto:sajjad5550@gmail.com)
- ۴- دانشیار پژوهشی، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران، پست الکترونیکی: [jhafezieh@yahoo.com](mailto:jhafezieh@yahoo.com)
- ۵- استادیار پژوهشی، پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بندرعباس، ایران، پست الکترونیکی: [siamakbehzady@gmail.com](mailto:siamakbehzady@gmail.com)

تاریخ دریافت: ۹۸/۱۱/۱۴

\* نویسنده مسوول

تاریخ پذیرش: ۹۹/۲/۲۲

### چکیده

اهداف پژوهش حاضر ارائه فرایندی برای جداسازی انتخابی اکتینوباکتری‌های مرتبط با اسفنج‌های خلیج فارس و همچنین یافتن جدایه‌های مولد متابولیت‌های آنتی‌اکسیدان و سیتوتوکسیک بود. نمونه برداری از ۴ گونه اسفنج پیرامون جزیره لارک واقع در خلیج فارس با استفاده از غواصی انجام شد. برای جداسازی انتخابی از ۷ تیمار فیزیکی و شیمیایی و ۴ محیط کشت استفاده شد. سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی متابولیت‌های استخراج شده با استفاده از روش سنجش مهار رادیکال‌های آزاد دی فنیل ۱- پیکریل هیدرازیل (DPPH) و فعالیت سیتوتوکسیک با استفاده از آزمون سمیت میگوی آب شور بصورت مایکروداپلوشن انجام شد. از ۱۱۴ جدایه اکتینوباکتری ۳۸/۵۹ درصد از اسفنج *Dysidea avara* جداسازی شدند. محیط کشت اسفنج دریایی آگار (MSA) با جداسازی ۴۴ جدایه بیشترین کارایی را از لحاظ فراوانی ارائه نمود. در حالیکه محیط مارین زوبل آگار (MZA) بیشترین میزان جدایه‌های غیر استرپتومایسس را جداسازی نمود. تیمار حرارت دادن با جداسازی ۳۵/۰۸ درصد از جدایه‌های اکتینوباکتری بیشترین فراوانی را ایجاد نمود. ۴۶ درصد از متابولیت‌های استخراج شده بیش از ۹۰ درصد رادیکال‌های آزاد DPPH را در محدوده  $IC_{50}$  از  $230/1 \mu g/ml$  تا  $775/34 \mu g/ml$  مهار نمودند. در حالیکه ۴۴ درصد از متابولیت‌های استخراج شده بیش از ۹۰ درصد سلولهای آرتیمیا را در محدوده  $LC_{50}$  از  $65/15 \mu g/ml$  تا  $782/32$  از بین بردند. این پژوهش ضمن ارائه یک فرایند جداسازی انتخابی، حضور و پتانسیل بالای اکتینوباکتری‌ها را به عنوان بخشی از میکروبیوتای فعال مرتبط با اسفنج‌های خلیج فارس نشان داد. جدایه‌های بدست آمده می‌توانند منبع بالقوه‌ای برای یافتن ترکیبات طبیعی دارویی باشند.

کلمات کلیدی: میکروبیوم اسفنج، محیط کشت جداسازی، متابولیت‌های سیتوتوکسیک، تیمارهای انتخابی، مهار DPPH

## ۱. مقدمه

جداسازی انتخابی این باکتری‌های شاخص و ارزیابی فعالیت سیتوتوکسیک و آنتی‌اکسیدانی آنها می‌تواند چشم اندازی از نقش باکتریها در اسفنج‌های میزبان تبیین نماید. مطالعات مختلفی در زمینه جداسازی و ارزیابی فعالیت ضد میکروبی، آنتی‌اکسیدانی و سیتوتوکسیک اکتینوباکتریها در رسوبات خلیج فارس (Gozari et al., 2016; Gozari et al., 2018a; Gozari et al., 2019a; Gozari et al., 2019c; Gozari et al., 2019b). لیکن در زمینه اکتینوباکتری‌های مرتبط با اسفنج‌های خلیج فارس مطالعات کمی صورت گرفته است. در یک مطالعه گذری و همکاران آنالوگ جدید داروی ضد سرطان Olivomycin A را از یک سویه *Streptomyces* جداسازی شده از اسفنج *Dysedia avara* شناسایی و تعیین ساختار نمودند (Gozari et al., 2019b). خلیج فارس دارای ویژگی‌های فیزیکیوشیمیایی منحصر به فرد می‌باشد. دمای آب و شوری نسبتاً بالا آن و همچنین وجود آلاینده‌های آلی و فلزات سنگین که می‌تواند موجب ایجاد استرس اکسیداتیو در ارگانسیم‌های دریایی از جمله اسفنج‌ها گردد (Solan and Whiteley, 2016). از اینرو مطالعه باکتری‌های ارزشمندی چون اکتینوباکتری‌ها در این اکوسیستم حساس از جنبه‌های حفظ تنوع زیستی و کاربردهای بیوتکنولوژیک ضروری می‌باشد (Riegl and Purkis, 2012).

در این مطالعه جمعیت‌های اسفنج پیرامون جزیره لارک به عنوان منبع غربالگری انتخاب گردید. جمعیت‌های اسفنج این جزیره از متنوع‌ترین کلونی‌های اسفنج در خلیج فارس می‌باشند. اهداف پژوهش حاضر شامل دستیابی به بیشترین میزان فراوانی و تنوع زیستی اکتینوباکتری‌های مرتبط با اسفنج‌ها با ارائه یک فرایند جداسازی انتخابی بود. دومین هدف این مطالعه ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی و سیتوتوکسیک اکتینوباکتری‌های مرتبط با اسفنج‌های جمع‌آوری شده تعیین شد.

## ۲. مواد و روش‌ها

## ۲-۱ نمونه‌برداری از اسفنج‌های دریایی

نمونه برداری از اسفنج‌های دریایی در اسفند ماه ۱۳۹۴ از عمق حدود ۱۰-۱۵ متری جزیره لارک در مختصات جغرافیایی با عرض جغرافیایی ۳۳° ۲۵' ۲۶" و طول جغرافیایی ۴۶° ۳۳' ۵۶"

مطالعه میکروبیوم اسفنج‌های دریایی به عنوان راهبردی موفق جهت یافتن ترکیبات طبیعی جدید مطرح شده است (Brinkmann et al., 2017). اکوسیستم خلیج فارس به عنوان یک منبع بکر، پتانسیل بالقوه‌ای برای اکتشاف ترکیبات طبیعی دریایی فراهم می‌نماید. ارگانسیم‌های دریایی از قبیل اسفنج‌ها در مقابل تهدیدات زیستی پیرامون خود مانند شکارچیان، عوامل بیماری‌زا و عوامل چسبندگی زیستی (فولینگ) متابولیت‌هایی با فعالیت‌های زیستی متنوع از جمله سیتوتوکسیک و آنتی‌اکسیدان تولید نموده و بدین ترتیب استراتژی دفاع شیمیایی خود را اعمال می‌نمایند (Helber et al., 2018).

در این میان نقش میکروبیوم اسفنج‌ها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار بوده تا آنجا که منشاء بسیاری از متابولیت‌های ثانویه استخراج شده از اسفنج‌ها را به میکروبیوم آنها منتسب نموده‌اند. این نظریه نقش اسفنج‌ها را در حد یک فرمانتور میکروبی تقلیل داده و عملکرد اصلی در دفاع شیمیایی را به میکروبیوم آنها نسبت می‌دهد (Longford et al., 2019; Hentschel et al., 2006; Lurgi et al., 2019). این واقعیت که باکتری‌ها می‌توانند تا ۶۰ درصد بیومس اسفنج را در بر گیرند نظریه مذکور را تقویت می‌نماید (Hill et al., 2006). لیکن همچنان پاسخ قطعی به این سوال داغ و اساسی مستلزم پژوهش‌های گسترده از جمله مطالعه میکروبیوم اسفنج‌ها از قبیل باکتری‌های مرتبط با آن می‌باشد.

اولین گام در چنین مطالعاتی طراحی فرایندی برای جداسازی انتخابی باکتری‌های مرتبط با اسفنج‌ها است. طی فرایندهای جداسازی غیر انتخابی بدلیل فراهم نشدن احتیاجات تغذیه‌ای در محیط‌های کشت معمول اغلب باکتری‌های مرتبط با اسفنج‌ها قابل کشت نمی‌باشند (Schirmer et Colwell and Grimes, 2000; Webster et al., 2001; al., 2005). از اینرو جداسازی آنها مستلزم بهینه‌سازی فرایندهای جداسازی انتخابی با توجه به زیستگاه بومی باکتری‌ها می‌باشد. در گام بعدی فعالیت‌های زیستی آنها ارزیابی می‌گردد. اکتینوباکتری‌ها به عنوان مهمترین باکتری‌های توانمندی‌های بیوسنتزی در تولید متابولیت‌های ثانویه زیست فعال به خوبی شناخته شده‌اند (Manivasagan et al., 2014). در میان آنها گونه‌های مربوط به جنس *Streptomyces* به دلیل فعالیت‌های زیستی بالا و خصوصیات مورفولوژیک نسبتاً متمایز به عنوان شاخص در نظر گرفته می‌شوند (Liu et al., 2018).

کلسیم (CaCO<sub>3</sub>) = ۰/۰۰۲٪، سولفات آهن ۷ آبه (FeSO<sub>4</sub> . 7H<sub>2</sub>O) ۰/۰۰۱٪، آگار ۱/۸٪ در آب دریا فیلتر شده؛ محیط کشت گلیسرول آرژینین آگار (GAA) (گلیسرول ۰/۵٪، آرژینین ۰/۱٪، دی پتاسیم هیدروژن فسفات (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) ۰/۱٪، آگار ۱/۸٪ در آب دریا فیلتر شده) طراحی و ساخته شد. بعد از هموژناسیون و تهیه رقت‌های متوالی از سوسپانسیون بافت اسفنج در آب دریای استریل، به میزان ۲۰۰ μl روی محیط‌های تلقیح گردید. محیط‌های تلقیح شده در دمای ۲۸°C به مدت ۴ هفته از لحاظ رشد کلونی اکتینوباکتریها مورد بررسی قرار گرفتند (Zhang et al., 2008).

### ۳-۲ شناسایی جدایه‌های اکتینوباکتری

شناسایی جدایه‌های به‌دست‌آمده پس از خالص‌سازی بر اساس ویژگی‌های مورفولوژیک شامل خصوصیات ماکروسکوپی مانند رنگ، شکل، حالت و اندازه کلونی و همچنین خصوصیات میکروسکوپی مانند شکل و آرایش جدایه در رنگ‌آمیزی گرم صورت پذیرفت (Goodfellow et al., 2012). با توجه به اهمیت جنس *Streptomyces* در میان اکتینوباکتریها جدایه‌ها بر اساس شباهت به این جنس به دو دسته شبیه *Streptomyces* و متفاوت از *Streptomyces* تقسیم بندی شدند (Bredholt et al., 2008).

### ۴-۲ استخراج متابولیت‌های زیست‌فعال از محیط کشت

کلونی‌های خالص‌شده از هر جدایه در ۵۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت نشاسته کازئین نیترات مایع تلقیح شد. پس از ۵ روز گرماگذاری در دمای ۲۸°C با دور ۲۲۰ rpm مایع تخمیری ایجاد شده با استفاده از فیلتراسیون از بیومس باکتری جداسازی شد. به منظور استخراج از روش استخراج مایع-مایع با حجم مساوی از حلال اتیل استات استخراج استفاده شد. به منظور افزایش کارایی فرایند استخراج با سه بار تکرار انجام شد. فاز آلی استخراج شده پس از جداسازی در قیف جداکننده با استفاده از دستگاه تبخیرکننده چرخان تحت خلأ و در دمای ۳۷°C تبخیر گردید (Seidel, 2005).

### ۵-۲ سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی متابولیت‌های استخراج شده

فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره متابولیت‌های استخراج‌شده از جدایه‌های متمایز اکتینوباکتری در غلظت نهایی ۱۲۵۰ μg/ml با

انجام شد. بیش از ۲۰ نمونه اسفنج بوسیله غواصی جمع‌آوری شده و در بطری‌های استریل قرار داده شدند. نمونه‌ها تا رسیدن به آزمایشگاه در کنار یخ در دمای حدود ۴ درجه سلسیوس نگهداری شدند. نمونه‌های جمع‌آوری شده بر اساس ویژگی‌های مورفولوژیک شامل ویژگی‌های موفومتریک و مورفومریستیک توسط پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان شناسایی شد (Hooper, 2000).

### ۲-۲ جداسازی اکتینوباکتری‌ها از نمونه‌های اسفنج

#### ۱-۲ تیمارهای فیزیکی و شیمیایی

به‌منظور بررسی تاثیر تیمارهای فیزیکی بر جداسازی اکتینوباکتریها در راستای انتخابی شدن فرایند جداسازی تیمارهای فیزیکی و شیمیایی انجام شد. تیمارهای فیزیکی از قبیل تیمار حرارت دادن شامل قرار دادن سوسپانسیون بافت هموژن شده اسفنج‌های جمع‌آوری شده در ۵۰°C به مدت ۶۰ دقیقه (Hames-Kocabas and Ataç, 2012)، تیمار خشک کردن شامل نگهداری بافت اسفنج‌ها در زیر هود لامینار به مدت دو هفته (Jensen et al., 2005)، تیمار پرتو فرابنفش با طول موج ۲۵۴ nm در فاصله ۲۰ cm از بافت اسفنج به مدت ۳۰ ثانیه (Bredholdt et al., 2007)، تیمار سوسپانسیون بافت هموژن شده اسفنج با امواج فراصوت ۴۰ KHZ به مدت دو دقیقه در دمای ۳۰°C (Qiu et al., 2008)، تیمار فریز کردن بافت اسفنج در دمای ۲۱°C- به مدت ۲۴ ساعت انجام شد (Jensen et al., 2005). تیمار شیمیایی با افزودن فنول در غلظت نهایی ۱/۵ درصد به سوسپانسیون همژن شده بافت اسفنج به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۰°C صورت گرفت (Bredholt et al., 2008).

#### ۲-۲-۲ طراحی محیط‌های کشت و تلقیح

به منظور بررسی تاثیرات محیط کشت در جداسازی انتخابی اکتینوباکتریها چهار محیط کشت جداسازی متنوع شامل محیط کشت اسفنج دریایی آگار (MSA) (Gozari et al., 2019b)؛ محیط کشت مارین زوبیل آگار (MZA) حاوی پپتون ۰/۵٪، عصاره مخمر ۰/۱٪، کلرید منیزیم (MgCl<sub>2</sub>) ۰/۸٪، کلرید کلسیم (CaCl<sub>2</sub>) ۱/۶٪، آگار ۱/۵٪ در آب دریا فیلتر شده؛ محیط کشت نشاسته کازئین نیترات آگار (SCNA) حاوی نشاسته ۱٪، کازئین ۰/۰۳٪، نیترات پتاسیم (KNO<sub>3</sub>) ۰/۲٪، دی پتاسیم هیدروژن فسفات (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) ۰/۲٪، سولفات منیزیم ۷ آبه (MgSO<sub>4</sub> . 7H<sub>2</sub>O) ۰/۰۰۵٪، کربنات

LC<sub>50</sub> جدایه‌های دارای بیشترین فعالیت سیتوتوکسیک، رقیق‌سازی در غلظت‌های پایین‌تر شامل ۵۰۰، ۲۵۰، ۱۲۵ و ۶۲/۵ انجام شد.

$$\text{درصد فعالیت سیتوتوکسیک} = \frac{(N_{\text{control}}) - (N_{\text{test}})}{(N_{\text{control}})} \times 100$$

$N_{\text{test}}$ : تعداد ناپلی زنده در چاهک تیمار شده  
 $N_{\text{control}}$ : تعداد ناپلی زنده در چاهک تیمار نشد

## ۲-۷ آنالیز آماری

آزمون‌های صورت گرفته با سه تکرار انجام شد. آنالیز داده‌های بدست آمده از فرایند جداسازی باکتری‌ها با استفاده از نرم‌افزار Microsoft™ Excel 2013 (Microsoft, Seattle, WA) محاسبه شد. داده‌های سنجش فعالیت سیتوتوکسیک و آنتی-اکسیدانی به صورت میانگین ± خطای استاندارد (SE) ارائه گردید. LC<sub>50</sub> و IC<sub>50</sub> در سطوح اطمینان ۹۵٪ به وسیله رگرسیون غیرخطی با استفاده از نرم‌افزار Graphpad (GraphPad Software, Inc.) prism 6 محاسبه گردید.

## ۳. نتایج و بحث

بررسی ویژگی‌های مورفولوژیک نمونه‌های اسفنج بیانگر تعلق آنها به چهار گونه شامل *Axinella sinoxea*، *Dysidea avara*، *Niphatea sp.* و *Haliclona sp.* بود (شکل ۱). طراحی و بهینه‌سازی فرایندهای جداسازی انتخابی اکتینوباکتری‌ها موجب دستیابی به بیشترین فراوانی، تنوع و افزایش احتمال یافتن ترکیبات زیست فعال جدید می‌گردد (Zotchev, 2012). نتایج مطالعه حاضر تاثیر فرایند جداسازی انتخابی را بر فراوانی و تنوع اکتینوباکتری‌های مرتبط با اسفنج‌ها تایید نمود. جداسازی از ۴ جنس مختلف اسفنج منجر به جداسازی ۱۱۴ جدایه اکتینوباکتری گردید. نتایج الگوی فراوانی اکتینوباکتری‌ها نشان داد بیشترین تعداد جدایه‌های اکتینوباکتری از گونه *Dysidea avara* با ۴۴ جدایه معادل ۳۸/۵۹ درصد و بدنبال آن از گونه‌های *Axinella sinoxea*، *Haliclona sp.* و *Niphatea sp.* بترتیب (%/۲۵/۴۳)، (%/۲۱/۹۲) ۲۹ و (%/۱۴/۰۳) ۱۶ جدایه جداسازی گردید.

استفاده از روش سنجش مهار رادیکال‌های آزاد DPPH به صورت مایکرودیالوشن سنجش شد.

متابولیت‌های دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیش از ۹۰ درصد به منظور تعیین IC<sub>50</sub> در غلظت‌های نهایی ۶۲۵ μg/ml، ۳۱۲، ۱۵۶، ۷۸، ۳۹، ۱۹ مورد سنجش قرار گرفتند. از آسکوربیک اسید به عنوان ماده استاندارد و از متانول به عنوان کنترل منفی استفاده شد. همچنین از عصاره آلی محیط کشت باکتری به عنوان شاهد استفاده گردید. مقدار ۵ μl از هر رقت از عصاره متابولیت یا نمونه‌های کنترل به ۱۹۵ μl محلول DPPH (۱۰۰ μM) در هر چاهک موجود در میکروپلیت افزوده شد. پس از ۳۰ دقیقه نگهداری در دمای اتاق و تاریکی، جذب نمونه‌ها در ۵۱۷ nm با استفاده از دستگاه (BioTech Microplate reader instrument) اندازه‌گیری شد. درصد فعالیت مهار رادیکال‌های آزاد DPPH با استفاده از معادله زیر محاسبه گردید (Leong and Shui, 2002).

$$\text{درصد فعالیت مهار رادیکال‌های آزاد DPPH} = \frac{(I_0) - (I_{\text{sample}})}{I_0} \times 100$$

$I_0$ : جذب در چاهک حاوی DPPH ۱۹۵ μl + ۵ μl متانول  
 $I_{\text{sample}}$ : جذب در چاهک نمونه یا کنترل

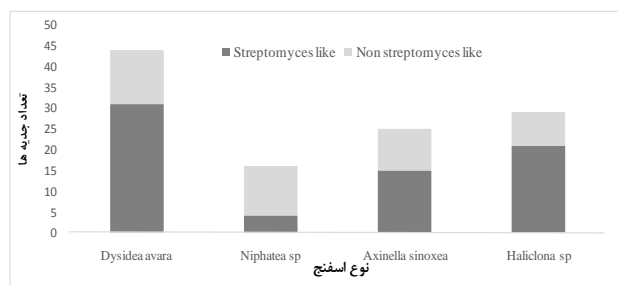
## ۲-۶ سنجش فعالیت سیتوتوکسیک متابولیت‌های استخراج شده

فعالیت سیتوتوکسیک متابولیت‌های استخراج شده از جدایه‌های متمایز اکتینوباکتری با استفاده از روش Brine-Shrimp microwell cytotoxicity method مورد غربالگری قرار گرفت (Atta-ur-Rahman, 2001). جهت کشت سلول‌های *Artemia franciscana* حدود یک گرم از سیست آرتمیا تهیه شده از شرکت INVE بلژیک در یک ارلن حاوی دو لیتر آب دریا فیلتر شده با شوری ۳۰ ppt تلقیح شد. انکوباسیون در محدوده ۲۹-۲۲ در معرض نور سفید و با هوادهی به مدت ۴۸ ساعت انجام گرفت. پس از جمع‌آوری سلول‌های ناپلی، سوسپانسیون با تراکم ۱۵۰-۱۰۰ ناپلی در میلی‌لیتر تهیه شد. به دنبال آن ۱۰۰ μl از سوسپانسیون مذکور به ۱۰۰ μl محلول عصاره با غلظت نهایی ۱۰۰۰ μg/ml در هر چاهک افزوده شد. پس از گرماگذاری در ۲۵ °C به مدت ۲۴ ساعت، تعداد ناپلی‌های زنده و مرده ثبت گردید. از متانول به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. به منظور تعیین



شکل ۱: نمونه‌های اسفنج جمع‌آوری شده. الف. *Dysidea avara*. ب. *Axinella sinoxea*. ج. *Haliclona* sp. د. *Niphatea* sp.

مطالعه دیگری در زمینه تنوع زیستی اکتینوباکتریهای مرتبط با اسفنج دریایی *Iotrochota* sp. نشان داد استرپتومایسس‌ها غالب جمعیت اکتینوباکتری‌های مرتبط با این اسفنج را تشکیل دادند (Jiang et al., 2008). همچنین در یک مطالعه اکتینوباکتری‌های مرتبط با اسفنج *Dendrilla nigra* غالب بودن استرپتومایسس‌ها به میزان ۲۳/۹۱ درصد کل جدایه‌های اکتینوباکتری گزارش شد (Selvin et al., 2009).



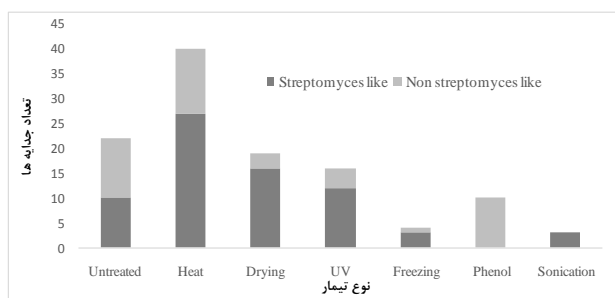
شکل ۲: میزان حضور اکتینوباکتری‌های قابل کشت در اسفنج‌های نمونه‌برداری شده

این الگوی تنوع و غالب بودن استرپتومایسس‌ها با توجه به توانمندی‌های فیزیولوژیک نسبتاً برتر آنها از قبیل رشد سریعتر

نتایج الگوی تنوع اکتینوباکتری‌ها در نمونه‌های اسفنج از نظر شباهت به جنس *Streptomyces* بیانگر حضور گسترده جدایه‌های شبیه به *Streptomyces* در همه نمونه‌های مورد بررسی به استثنای جنس *Niphatea* sp. بود (شکل ۲). بطوریکه جدایه‌های شبیه به *Streptomyces* بیش از ۷۰ درصد جدایه‌های مرتبط با *D. avara* و *Haliclona* sp. و ۶۰ درصد جدایه‌های بدست آمده از *A. sinoxea* را تشکیل دادند. در صورتیکه در *Niphatea* این روند معکوس و ۷۵ درصد جدایه‌ها غیر استرپتومایسس بودند (شکل ۲). این الگوی تنوع زیستی می‌تواند تابع متغیرهای پیچیده‌ای از قبیل میزان تخلخل و ترکیب شیمیایی بافت اسفنج، متابولیسم و فیزیولوژی اسفنج، حجم فیلتراسیون آب، موقعیت جغرافیایی، شرایط فیزیکوشیمیایی محیط، تغییر فصول و اقلیم باشد (Weisz et al., 2008). در مطالعات دیگر نیز غلبه استرپتومایسس‌ها در نمونه‌های اسفنج گزارش شده است. برای نمونه Zhang و همکارانش در مطالعه اعلام نمودند ۷۳/۶ درصد از جدایه‌های بدست آمده از اسفنج *Hymeniacidon perleve* به جنس *Streptomyces* تعلق داشتند (Zhang et al., 2006).

می‌تواند باعث افزایش قابلیت کشت پذیری و رشد باکتری‌های همزیست گردد (Bruns et al., 2002). عصاره اسفنج میزبان می‌تواند حاوی القاء کننده های انتخابی مذکور باشد و با افزودن آنها به محیط کشت جداسازی می‌توان نیازمندی غذایی باکتری‌های مرتبط با اسفنج میزبان را فراهم نمود و قابلیت کشت پذیری و میزان جداسازی را ارتقاء بخشید.

ارزیابی تاثیر تیمارهای فیزیکی و شیمیایی در انتخابی نمودن فرایند جداسازی بیانگر کارایی بالاتر تیمار حرارت دادن در بازیابی بیشترین فراوانی به میزان ۳۵/۰۸ درصد معادل ۴۰ جدایه اکتینوباکتری بود (شکل ۴). این نتیجه می‌تواند بدلیل عملکرد انتخابی تیمار حرارت دادن در حذف فرم های رویشی حساس به حرارت و تقویت رشد انواع اسپورزا باشد. برخی از اکتینوباکتریها بویژه استرپتومایسس ها که در مطالعه حاضر دارای فراوانی نسبتا بالایی می باشند فرم های اسپوری تولید نموده که مقاومت نسبی به حرارت دارند. در مطالعات گذشته برتری تیمار حرارت دادن در جداسازی اکتینوباکتریها از نمونه های رسوب گزارش شده است (Gozari et al., 2019a; Gozari et al., 2019c). الگوی تنوع جدایه های اکتینوباکتری بدست آمده بوسیله تیمارهای مختلف بیانگر غالبیت جدایه های استرپتومایسس در اکثر تیمارهای اعمال شده بود. اگرچه تیمار با فنول تنها استثناء این روند بود که هیچ جدایه ای از استرپتومایسس بوسیله آن جداسازی نشد (شکل ۴).

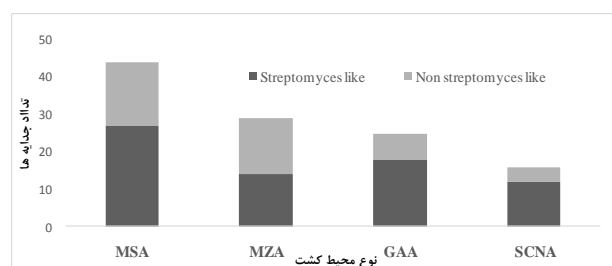


شکل ۴: تاثیر تیمارهای فیزیکی و شیمیایی بر میزان جداسازی اکتینوباکتریها از نمونه های اسفنج

این نتیجه می‌تواند بدلیل واکنش مخرب فنول با پروتئین‌های حاوی پلیمرهای پلی آمیدی در استرپتومایسس‌ها باشد (Istianto et al., 2012). این درحالی است که اکتینوباکتری‌های غیراسترپتومایسس با دارا بودن دیواره سلولی غنی از لیپید حساسیت پایین تری به فنول نشان می‌دهند. در مطالعه دیگری نیز تیمار با فنول منجر به افزایش جداسازی گونه‌های

نسبت به اکتینوباکتری‌های عمدتا کند رشد لزوم طراحی فرایند های جداسازی انتخابی را در راستای کاهش این برتری رقابتی و دستیابی به تنوع زیستی بیشتر را نشان می‌دهد.

نتایج تاثیر فرمولاسیون چهار محیط کشت مختلف بر فراوانی و تنوع اکتینوباکتری‌ها نشان داد محیط کشت اسفنج دریایی آگار (MSA) با جداسازی (۳۸/۵۹٪) ۴۴ جدایه بیشترین کارایی را در نشان داد. محیط‌های کشت مارین زوبل آگار (MZA)، گلیسرول آرژینین آگار (GAA)، نشاسته کازئین نیترات آگار (SCNA) با جداسازی بترتیب (۲۵/۴۳٪) ۲۹، (۲۱/۹۲٪) ۲۵ و (۱۴/۰۳٪) ۱۶ جدایه در مراتب بعدی قرار گرفتند (شکل ۳).



شکل ۳: میزان جداسازی اکتینوباکتری‌ها از نمونه‌های اسفنج در محیط‌های کشت مختلف

بررسی تاثیر محتوای محیط کشت بر الگوی تنوع زیستی اکتینوباکتری‌های جداسازی شده به تفکیک تشابه یا عدم تشابه با استرپتومایسس‌ها بیانگر جداسازی تنوع زیستی بیشتری از اکتینوباکتری‌ها در محیط‌های کشت MZA و MSA با جداسازی بترتیب ۳۸/۶۳ و ۵۱/۷۲ درصد از جدایه های غیر استرپتومایسس بود. در صورتی که در محیط کشت های SCNA و GAA بترتیب ۷۲ و ۷۵ درصد جدایه ها متعلق به استرپتومایسس ها بودند. مشاهدات ماکروسکوپی و میکروسکوپی مورفوتایپ های متنوعی را در این دو محیط کشت MZA و MSA نشان داد. وجود عصاره آبی بافت اسفنج میزبان در محیط کشت MSA می‌تواند شرایطی نزدیک به درون مزوهیل اسفنج را شبیه سازی نموده و به عنوان یک عامل احتمالی در افزایش فراوانی و تنوع اکتینوباکتری‌ها در این محیط کشت مطرح گردد. مطالعات اخیر نیز تولید القاء کننده های انتخابی مانند آسپیل هموسرین لاکتون (AHL) را بوسیله باکتری‌های مرتبط با اسفنج های دریایی ثابت نموده اند (Taylor et al., 2004). این ترکیبات دارای وزن مولکولی پایین در غلظت آستانه تاثیر خود بواسطه میانکنش با فعال کننده های رونویسی باعث راه انداختن بیان ژنهای هدف می‌گردند. افزودن این ترکیبات به محیط کشت جداسازی

از اکتینوباکتریهای مرتبط و همزیست در جهت اعمال راهبرد دفاعی شیمیایی در مقابل تهدیدات زیستی از قبیل شکارچیان، پاتوژن‌ها و عوامل فولینگ در اکوسیستم دریایی ارائه می‌نماید. مطالعات مختلف نیز عملکرد حیاتی اکتینوباکتریها را در اسفنج-های میزبان تایید نموده اند (Hildebrand et al., 2004).

جدول ۲: میزان فعالیت سیتوتوکسیک متابولیت‌های زیست‌فعال استخراج‌شده از جدایه‌های منتخب

جدایه	SE ±LC <sub>50</sub> (μg/ml)	جدایه	SE ±LC <sub>50</sub> (μg/ml)	جدایه	SE ±LC <sub>50</sub> (μg/ml)
۱۸ SP	۱۷/۳۳ ۳۵۳/۵۲±	۶۴SP	۳۱۷/۱۲±۲۷/۳۴	۹۵SP	۱۶/۲۱ ۱۳۱/۵۱±
۱۹SP	۰۳/۲۵۹/۰۱±۱۳	۶۵SP	۱۲/۳۲ ۳۶۵/۱۲±	۹۹SP	۱۵/۴۱۶/۱±۳۳
۳۴SP	۱۶۰/۳۱±۴۱/۰۱	۷۴SP	۱۸۲/۵۰±۱۷/۴۵	۱۰۰SP	۳۴۷/۱±۱۴/۱۴
۳۷SP	۱۳۴/۵۱±۱۸/۲۳	۷۶SP	۱۵۶/۴۱±۸/۱۹	۱۰۴SP	۴۲/۲۲ ۲۸۵/۱±
۳۸SP	۸۷/۳۳ ۷۸۲/۳۲±	۷۸SP	۹۶/۲۱±۱۳/۱۰	۱۰۷SP	۱۷۴/۴۱±۵۶/۵۰
۴۴SP	۴۳/۴۵۲/۰۹±۱۴	۸۵SP	۶۵/۱۵±۷/۲۰	۱۰۹SP	۱۹۷/۰۱±۲۱/۶۴
۴۸SP	۵۲۱/۰۴±۳۲/۳۴	۹۰SP	۱۲/۱۲ ۵۱۵/۱۶±		
۵۴SP	۱۲/۲۳ ۳۶۰/۳±	۹۴SP	۳۲/۲۲ ۴۳۵/۱۸±		

تعیین میزان LC<sub>50</sub> متابولیت‌های استخراج‌شده بیانگر فعالیت سیتوتوکسیک بالای آنها بود. به ویژه جدایه ۸۵ SP با LC<sub>50</sub> معادل ۶۵/۱۵ μg/ml بیشترین فعالیت سیتوتوکسیک را نشان داد. فعالیت سیتوتوکسیک بالای متابولیت‌های استخراج‌شده از اکتینوباکتریهای مرتبط با اسفنج‌ها در سایر مطالعات نیز به اثبات رسیده و ترکیبات دارویی بسیاری از آنها گزارش شده است (Carroll et al., 2019; Mehub et al., 2016; Zhang et al., 2017) در همین زمینه Palaniappan و همکاران فعالیت سیتوتوکسیک استرپتومایسس دریایی سویه CAS72 را در مقابل آرتمیا معادل LC<sub>50</sub> برابر با 23.5 μg/ml گزارش نمودند (Palaniappan et al., 2013).

#### ۴. نتیجه‌گیری کلی

نتایج این پژوهش استراتژی کارآمدی متشکل از ترکیبی از تیمارها و محیط‌های کشت مختلف را به منظور انتخابی نمودن فرایند جداسازی اکتینوباکتریها ارائه نمود. همچنین بر اساس نتایج الگوی فعالیت آنتی‌اکسیدانی و سیتوتوکسیک بدست آمده حضور اکتینوباکتریها به عنوان بخشی فعال از میکروبیوتای مرتبط با اسفنج‌های جمع‌آوری شده تایید گردید. جدایه‌های بدست آمده می‌توانند منبع نویدبخشی جهت ادامه مطالعات در زمینه شناسایی ترکیبات آنتی‌اکسیدان و سیتوتوکسیک باشند.

میکرومونوسپورا نسبت به استرپتومایسس‌ها گردید (Qiu et al., 2008).

الگوی فعالیت آنتی‌اکسیدانی ۵۰ جدایه متمایز بر اساس ویژگیهای مورفولوژیک، بیانگر فعالیت بیش از ۹۰ درصدی حدود ۴۶ درصد از جدایه‌ها در مهار رادیکال‌های آزاد DPPH بود. نتایج نشان داد میزان IC<sub>50</sub> فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره متابولیت‌های با فعالیت بیش از ۹۰ درصد از ۲۳۰/۱ μg/ml تا ۷۷۵/۳۴ متغیر بود (جدول ۱).

جدول ۱: میزان مهار رادیکال‌های آزاد DPPH توسط متابولیت‌های زیست‌فعال استخراج‌شده از جدایه‌های منتخب

جدایه	IC <sub>50</sub> ±SE (μg/ml)	جدایه	IC <sub>50</sub> ±SE (μg/ml)	جدایه	IC <sub>50</sub> ±SE (μg/ml)
SP* ۱۸	۵۱۱/۱± ۱۲/۱۳	SP ۶۴	۶۱۵/۲± ۲۱/۴۲	SP ۹۰	۷۷۵/۳± ۱۸/۷۱
SP ۱۹	۳۱۱/۶± ۲۱/۵۲	SP ۶۵	۴۲۳/۱±۱۲/۰۳	SP ۹۴	۵۱۴/۱±۳۹/۰۲
SP ۳۴	۵۳۱/۴± ۲۳/۴۶	SP ۶۶	۲۸۳/۲±۲۱/۰۲	SP ۹۵	۶۱۳/۸±۳۵/۱۱
SP ۳۷	۳۲۱/۱±۱۱/۱۳	SP ۷۴	۳۱۲/۵±۲۵/۵۱	SP ۹۹	۳۱۴/۸±۱۰/۵۱
SP ۳۸	۴۴۶/۴±۱۷/۳۴	SP ۷۶	۳۳۷/۸±۳۹/۳۲	SP ۱۰۰	۳۴۱/۸±۳۹/۱۲
SP ۴۴	۵۶۰/۱± ۱۶/۱۲	SP ۷۸	۷۵۰/۰± ۵۱/۲۱	SP ۱۰۴	۵۱۳/۰± ۳۷/۳۲
SP۴۸	۳۲۲/۳± ۱۵/۵۱	SP ۸۴	۳۳۱/۱±۱۳/۵۳	SP ۱۰۷	۳۳۲/۱±۲۴/۵۱
SP ۵۴	۴۲۲/۳± ۱۵/۵۱	SP ۸۵	۲۳۰/۱±۲۲/۲۰		

\*SP: Sponge

الگوی ایجاد شده بیانگر نقش مهم اکتینوباکتریهای جداسازی شده در اسفنج‌های میزبان می‌باشد. وجود سطوح بالای گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) در بی‌مهرگان دریایی تهدیدی بالقوه برای ارگانسیم محسوب می‌گردد. به همین دلیل اسفنج‌های دریایی ناگزیر به اتخاذ استراتژی‌های دفاعی به منظور خنثی‌سازی سطوح بالای ROS با استفاده از تولید ترکیبات آنتی‌اکسیدان می‌باشند (Velho-Pereira et al. 2015). در مطالعات مختلف نیز فعالیت آنتی‌اکسیدانی بسیاری از متابولیت‌های استخراج‌شده از بی‌مهرگان دریایی گزارش شده است. به عنوان نمونه در مطالعه دیگری Motohashi و همکارانش موفق به شناسایی دو پپتید با فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالا به نامهای JBIR-34 و JBIR-35 از اکتینوباکتریهای مرتبط با اسفنج شدند (Motohashi et al., 2010).

الگوی فعالیت سیتوتوکسیک نشان داد ۲۲ جدایه معادل ۴۴ درصد از جدایه‌های بررسی شده بیش از ۹۰ درصد سلولهای آرتمیا را از بین بردند. میزان LC<sub>50</sub> فعالیت سیتوتوکسیک متابولیت‌های استخراج‌شده از جدایه‌های با فعالیت بیش از ۹۰ درصد از ۶۵/۱۵ μg/ml تا ۷۸۲/۳۲ در مقابل آرتمیا متغیر بود (جدول ۲). این نتیجه شاهد دیگری از بهره‌برداری اسفنج‌ها

## ۵. سپاسگزاری

نویسندگان مقاله از حمایت پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان در اجرای این پروژه قدردانی می نمایند.

## منابع

- 10.1007/978-1-4757-0271-2
- Goodfellow, M.; Kämpfer, P.; Busse, H.-J.; Trujillo, M.E.; Suzuki, K.-i.; Ludwig, W.; Whitman, W.B., 2012. *Bergey's manual® of systematic bacteriology: Volume five the actinobacteria, part a*. Springer New York. DOI: 10.1007/978-0-387-68233-4
- Gozari, M.; Bahador, N.; Jassbi, A.R.; Eftekhar, E., 2018a. Isolation and evaluation of cytotoxic and antioxidant activity of bioactive metabolites of cultured actinobacteria in persian gulf marine sediments. *Journal of Aquatic Ecology*, 7: 57-67.
- Gozari, M.; Bahador, N.; Jassbi, A.R.; Mortazavi, M.; Eftekhar, E., 2018b. Antioxidant and cytotoxic activities of metabolites produced by a new marine streptomyces sp. Isolated from the sea cucumber holothuria leucospilota. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 17: 413-426.
- Gozari, M.; Bahador, N.; Jassbi, A.R.; Mortazavi, M.S.; Hamzehei, S.; Eftekhar, E., 2019a. Isolation, distribution and evaluation of cytotoxic and antioxidant activity of cultivable actinobacteria from the oman sea sediments. *Acta Oceanologica Sinica*, 38: 84-90. DOI: 10.1007/s13131-019-1515-2
- Gozari, M.; Bahador, N.; Mortazavi, M.S.; Eftekhar, E.; Jassbi, A.R., 2019b. An "olivomycin a" derivative from a sponge-associated streptomyces sp. *Strain sp 85. 3 Biotech*, 9: 439-450. DOI: 10.1007/s13205-019-1964-5
- Gozari, M.; Mortazavi, M.; Ebrahimi, M.; Dehghani, R., 2016. Isolation, identification and evaluation of antimicrobial activity of actinomycetes from marine sediments of persian gulf (hormozgan province). *Iranian Scientific Fisheries Journal*, 25: 81-94.
- Gozari, M.; Zaheri, A.; Jahromi, S.T.; Gozari, M.; Karimzadeh, R., 2019c. Screening and characterization of marine actinomycetes from the northern oman sea sediments for cytotoxic and antimicrobial activity. *International Microbiology*: 22:521-530. DOI:
- Atta-ur-Rahman, C.M., Thomsen WJ. 2001. *Bioassay techniques for drug development*. Pp. eds. Harwood Academic Publishers, Australia. DOI: 10.3109/9780203304532
- Bredholdt, H.; Galatenko, O.A.; Engelhardt, K.; Fjærvik, E.; Terekhova, L.P.; Zotchev, S.B., 2007. Rare actinomycete bacteria from the shallow water sediments of the trondheim fjord, norway: Isolation, diversity and biological activity. *Environmental microbiology*, 9:2756-2764. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2007.01387.x
- Bredholt, H.; Fjærvik, E.; Johnsen, G.; Zotchev, S.B., 2008. Actinomycetes from sediments in the trondheim fjord, norway: Diversity and biological activity. *Marine drugs*, 6: 12-24. DOI: 10.3390/md6010012
- Brinkmann, C.M.; Marker, A.; Kurtböke, D.I., 2017. An overview on marine sponge-symbiotic bacteria as unexhausted sources for natural product discovery. *Diversity*, 9: 40. DOI: 10.3390/d9040040
- Bruns, A.; Cypionka, H.; Overmann, J., 2002. Cyclic amp and acyl homoserine lactones increase the cultivation efficiency of heterotrophic bacteria from the central baltic sea. *Applied and Environmental Microbiology*, 68:3978-3987. DOI: 10.1128/AEM.68.8.3978-3987. 2002
- Carroll, A.R.; Copp, B.R.; Davis, R.A.; Keyzers, R.A.; Prinsep, M.R., 2019. *Marine natural products. Natural product reports*, 36: 122-173. DOI: 10.1039/C8NP00092A
- Colwell, R.R.; Grimes, D.J., 2000. *Nonculturable microorganisms in the environment*. ASM press. DOI:



- Y.; Lee, K.J., 2008. Culturable actinobacteria isolated from marine sponge *Iotrochota* sp. *Marine Biology*, 153: 945-952. DOI: 10.1007/s00227-007-0866-y
- Leong, L.; Shui, G., 2002. An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. *Food Chemistry*, 76: 69-75. DOI: 10.1016/S0308-8146(01)00251-5
- Liu, R.; Deng, Z.; Liu, T., 2018. *Streptomyces* species: Ideal chassis for natural product discovery and overproduction. *Metabolic Engineering*, 50: 74-84. DOI: 10.1016/j.ymben.2018.05.015
- Longford, S.R.; Campbell, A.H.; Nielsen, S.; Case, R.J.; Kjelleberg, S.; Steinberg, P.D., 2019. Interactions within the microbiome alter microbial interactions with host chemical defences and affect disease in a marine holobiont. *Scientific Reports*, 9: 1-13. DOI: 10.1038/s41598-018-37062-z
- Lurgi, M.; Thomas, T.; Wemheuer, B.; Webster, N.S.; Montoya, J.M., 2019. Modularity and predicted functions of the global sponge-microbiome network. *Nature Communications*, 10: 1-12. DOI: 10.1038/s41467-019-08925-4
- Manivasagan, P.; Venkatesan, J.; Sivakumar, K.; Kim, S.-K., 2014. Pharmaceutically active secondary metabolites of marine actinobacteria. *Microbiological Research*, 169: 262-278. DOI: 10.1016/j.micres.2013.07.014
- Mehbub, M.F.; Perkins, M.V.; Zhang, W.; Franco, C.M., 2016. New marine natural products from sponges (porifera) of the order dictyoceratida (2001 to 2012); a promising source for drug discovery, exploration and future prospects. *Biotechnology Advances*, 34: 473-491. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2015.12.008
- Motohashi, K.; Takagi, M.; Shin-ya, K., 2010. Tetrapeptides possessing a unique skeleton, jbir-34 and jbir-35, isolated from a sponge-derived actinomycete, *Streptomyces* sp. Sp080513ge-23. *Journal of Natural Products*, 73: 226-228. DOI: 10.1021/np900810r
- 10.1007/s10123-019-00083-3
- Hames-Kocabas, E.E.; Ataç, U., 2012. Isolation strategies of marine-derived actinomycetes from sponge and sediment samples. *Journal of Microbiological Methods*, 88: 342-347. DOI: 10.1016/j.mimet.2012.01.010
- Helber, S.B.; Hoeijmakers, D.J.; Muhandu, C.A.; Rohde, S.; Schupp, P.J., 2018. Sponge chemical defenses are a possible mechanism for increasing sponge abundance on reefs in Zanzibar. *PLoS ONE*, 13(6): e0197617. DOI: 10.1371/journal.pone.0197617
- Hentschel, U.; Usher, K.M.; Taylor, M.W., 2006. Marine sponges as microbial fermenters. *FEMS Microbiology Ecology*, 55: 167-177. DOI: 10.1111/j.1574-6941.2005.00046.x
- Hildebrand, M.; Waggoner, L.E.; Lim, G.E.; Sharp, K.H.; Ridley, C.P.; Haygood, M.G., 2004. Approaches to identify, clone, and express symbiont bioactive metabolite genes. *Natural Product Reports*, 21: 122-142. DOI: 10.1039/b302336m
- Hill, M.; Hill, A.; Lopez, N.; Harriott, O., 2006. Sponge-specific bacterial symbionts in the Caribbean sponge, *Chondrilla nucula* (Demospongiae, Chondrosida). *Marine Biology*, 148: 1221-1230. DOI: 10.1007/s00227-005-0164-5
- Hooper, J.N., 2000. Guide to sponge collection and identification. Queensland Museum: 1-138.
- Istianto, Y.; Koesomowidodo, R.S.A.; Watanabe, Y.; Pranamuda, H.; Marwoto, B., 2012. Application of phenol pretreatment for the isolation of rare actinomycetes from Indonesian soil. *Microbiology Indonesia*, 6: 42-47. DOI: 10.5454/mi.6.1.7
- Jensen, P.R.; Gontang, E.; Mafnas, C.; Mincer, T.J.; Fenical, W., 2005. Culturable marine actinomycete diversity from tropical Pacific Ocean sediments. *Environmental Microbiology*, 7: 1039-1048. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2005.00785.x
- Jiang, S.; Li, X.; Zhang, L.; Sun, W.; Dai, S.; Xie, L.; Liu,

- environment: Physiological and ecological responses; societal implications. Oxford University Press. DOI: 10.1093/acprof:oso/9780198718826.001.0001
- Taylor, M.W.; Schupp, P.J.; Baillie, H.J.; Charlton, T.S.; De Nys, R.; Kjelleberg, S.; Steinberg, P.D., 2004. Evidence for acyl homoserine lactone signal production in bacteria associated with marine sponges. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 4387-4389. DOI: 10.1128/AEM.70.7.4387-4389.2004
- Webster, N.S.; Wilson, K.J.; Blackall, L.L.; Hill, R.T., 2001. Phylogenetic diversity of bacteria associated with the marine sponge *rhopaloeides odorabile*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 434-444. DOI: 10.1128/AEM.67.1.434-444.2001
- Weisz, J.B.; Lindquist, N.; Martens, C.S., 2008. Do associated microbial abundances impact marine demosponge pumping rates and tissue densities? *Oecologia*, 155: 367-376. Zhang, H.; Lee, Y.K.; Zhang, W.; Lee, H.K., 2006. Culturable actinobacteria from the marine sponge *hymeniacidon perleve*: Isolation and phylogenetic diversity by 16s rRNA gene-rflp analysis. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 90: 159-169. DOI: 10.1007/s10482-006-9070-1
- Zhang, H.; Zhang, W.; Jin, Y.; Jin, M.; Yu, X., 2008. A comparative study on the phylogenetic diversity of culturable actinobacteria isolated from five marine sponge species. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 93: 241-248. DOI: 10.1007/s10482-007-9196-9
- Zhang, H.; Zhao, Z.; Wang, H., 2017. Cytotoxic natural products from marine sponge-derived microorganisms. *Marine drugs*, 15: 68. DOI: 10.3390/md15030068
- Zotchev, S.B., 2012. Marine actinomycetes as an emerging resource for the drug development pipelines. *Journal of biotechnology*, 158: 168-175. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2011.06.002
- Palaniappan, S.; Panchanathan, M.; Packiyaraj, V.; Kannan, S.; Shanmugam, S.; Subramaniam, P.; Viswanathan, M.; Shanmugam, V.; Balasubramanian, T., 2013. Antibacterial and brine shrimp lethality effect of marine actinobacterium *streptomyces* sp. Cas72 against human pathogenic bacteria. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 3: 286-293. DOI: 10.1016/S2222-1808(13)60071-7
- Qiu, D.; Ruan, J.; Huang, Y., 2008. Selective isolation and rapid identification of members of the genus *micromonospora*. *Applied and environmental microbiology*, 74: 5593-5597. DOI: 10.1128/AEM.00303-08
- Riegl, B.M.; Purkis, S.J., 2012. Coral reefs of the gulf: Adaptation to climatic extremes in the world's hottest sea. Pp. 1-4 in *Coral reefs of the gulf* Springer. DOI: 10.1007/978-94-007-3008-3\_1
- Schirmer, A.; Gadkari, R.; Reeves, C.D.; Ibrahim, F.; DeLong, E.F.; Hutchinson, C.R., 2005. Metagenomic analysis reveals diverse polyketide synthase gene clusters in microorganisms associated with the marine sponge *discodermia dissoluta*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 4840-4849. DOI: 10.1128/AEM.71.8.4840-4849.2005
- Seidel, V., 2005. Initial and bulk extraction. *Natural products isolation*: 27-46. DOI: 10.1385/1-59259-955-9:27
- Selvin, J.; Gandhimathi, R.; Kiran, G.S.; Priya, S.S.; Ravji, T.R.; Hema, T., 2009. Culturable heterotrophic bacteria from the marine sponge *dendrilla nigra*: Isolation and phylogenetic diversity of actinobacteria. *Helgoland marine research*, 63: 239-247. DOI: 10.1007/s10152-009-0153-z
- Solan, M.; Whiteley, N., 2016. Stressors in the marine