



ORIGINAL RESEARCH PAPER (Marine Science)

Optimization Amylase Production in Bacteria from Marine Sponges

Matroodi, S.^{1*}, Shakeri, S.², Jomehzadeh, N.³¹ Department of Marine biology, Faculty of Marine Science and oceanography, Khorramshahr University of marine science and technology, Iran² Department of biology, Faculty of Science, Islamic Azad University Borujerd branch, Borujerd, Iran³ Departments of Microbiology, School of Medicine, Abadan University of Medical Sciences, Abadan, Iran

ARTICLE INFO

Code: A-10-1195-2

Article History:

Received: 2020/02/1

Revised: 2021/11/24

Accepted: 2021/08/29

Keywords:

Marine sponges

Amylase

Bacillus

16S rRNA

*Corresponding author:

✉ s.matroodi@kmsu.ac.ir

ABSTRACT

Background and Objectives: Enzymes are selective proteins that catalyze all metabolic reactions found in living organisms. Millions of enzymes are produced by prokaryotes and eukaryotes. Marine sponges have developed a enormous quantity of diverse microorganisms such as bacteria, fungi, viruses, protozoa, and single-celled algae and the nature of the sponge-microbe interaction is diverse. *Marine sponge's symbiotic bacteria* can comprise as much as 40% of sponge tissue volume. At least 32 bacterial phyla and candidate phyla were described from marine sponges by both cultivation-dependent and cultivation-independent techniques. Symbiotic microorganisms in sponges can be sources of various natural products, because metabolites previously ascribed to sponges have recently been demonstrated to be biosynthesized by symbionts. If symbiotic microorganisms from which some natural products are derived can be cultured, the microorganism could be used in a mass production of the bioactive compounds. The goal of this research is isolation of Amylolytic bacteria from marine sponges and optimization of bacterial growth and amylase production in most amylytic isolate. Symbiot bacteria were isolated using serial dilution method and differential analyses done for isolated bacteria. Most effective isolate was selected by using qualitative starch hydrolysis method.

Methods: Morphological and biochemical characteristics were studied using Bergey's manual of systematic bacteriology. Differential analyses were performed by catalase and Gram test TSI, H₂S, VP, MR tests. Preliminary screening and quantification of amylase activities were analysed in selected isolates by starch agar plate and dinitrosalicylic acid (DNS) method respectively. In order to optimize the enzyme production, the fermentation process was carried out under M9 medium using various sodium chloride concentrations (2–14%). To evaluate the effect of pH on the production of Amylase, the best amylase producer isolate was cultured at M9 medium with different pH rang 4-8. After incubation time it was subjected to amylase activity assay. Isolate SS1 was grown in M1 medium at 28°C for 7 days. DNA extraction was done using Cinnapure DNA Kit for isolation of DNA from gram positive bacteria. PCR amplification of 16S rRNA gene was performed, the specific actinomycete primers, F27 and R1492 were used to amplify 16S rDNA. The resultant 16S rRNA gene sequences were aligned manually with corresponding almost complete sequences. The 16S rRNA gene sequence search was performed using the BLAST program available from the National Centre for Biotechnology Information (NCBI) and the isolate was identified to generic level Using the CLUSTAL-X Multiple Sequence Alignment Program (Strasbourg, France), The Phylogenetic tree was constructed by Neighbor-Joining method using MEGA 6.06. The reliability of the phylogenetic tree was tested by bootstrap analysis using 1,000 replicates.

Findings: Biochemical analyses showed that all tests were catalase and Gram positive none of them produced H₂S and TSI, MR, VP tests were negative. According to 16S rRNA sequences result the most effective isolate was belong to Bacillus genus and Optimum growth condition was found at 12% NaCl concentration, 35°C temperature and pH 12. Maximum amylase activity in optimum condition was 109 Unit (one Unit is amount of enzyme that release one microgram of glucose in a minute).

Conclusion: The results showed that enzyme production is related to growth of bacteria conditions and the amylase gene should amplify from selected isolate and clone in suitable host for more studies.



NUMBER OF TABLES

1



NUMBER OF FIGURES

6



NUMBER OF REFERENCES

37

مقاله پژوهشی (علوم دریایی)

بهینه‌سازی تولید آمیلاز در باکتری همزیست با اسفنج‌های دریایی

سهیلا مطرودی^{۱*}، سعیده شاکری^۲، نبی جمعه‌زاده^۳^۱ گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، ایران^۲ گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد، بروجرد، ایران^۳ گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی آبادان، آبادان، ایران

اطلاعات مقاله

چکیده

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۱/۱۲

تاریخ بازبینی: ۱۴۰۰/۹/۳

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۶/۷

واژگان کلیدی:

اسفنج‌های دریایی

آمیلاز

باسیلوس

16S rRNA

*نویسنده مسئول

✉ s.matroodi@kmsu.ac.ir



پیشینه و اهداف: آنزیم‌ها پروتئین‌هایی هستند که بطور انتخابی تمام واکنش‌های متابولیک را در موجودات زنده کاتالیز می‌کنند. میلیون‌ها آنزیم توسط پروکاریوت‌ها و یوکاریوت‌ها تولید می‌شوند. اسفنج‌های دریایی با ارگانسیم‌های مختلفی مانند باکتری‌ها، قارچ‌ها و ویروس‌ها، پروتوزوآها و موجودات تک سلولی بنام جلبک‌ها همزیستی دارند و طبیعت میانکنش اسفنج‌ها با میکرووب‌ها بسیار متنوع است. حدود ۴۰ درصد از حجم توده اسفنج از باکتری‌های همزیست تشکیل شده است. حداقل ۳۲ شاخه باکتریایی در اسفنج‌های دریایی شناخته شده‌است که توسط روش‌های وابسته به کشت و مستقل از کشت جداسازی شده‌اند. میکروارگانسیم‌های همزیست با اسفنج‌ها منبع ترکیبات مختلفی هستند که در گذشته گمان می‌رفت توسط اسفنج‌ها تولید می‌شوند که اکنون مشخص شده که توسط این میکروارگانسیم‌های همزیست مشتق شده‌اند. چنانچه باکتری‌های تولید کننده این ترکیبات جداسازی شوند می‌توان جهت تولید آنیوه آنها را کشت داد. هدف از این تحقیق جداسازی باکتری‌های تولید کننده آنزیم آمیلاز از اسفنج‌های دریایی و بهینه‌سازی شرایط رشد و تولید آنزیم آمیلاز در ایزوله برتر می‌باشد. باکتری‌های همزیست با اسفنج با استفاده از روش رقیق سازی سریالی و آنالیزهای افتراقی در باکتری‌های جدا شده انجام شد. فعال‌ترین ایزوله با استفاده از روش‌های کیفی و کمی هیدرولیز نشاسته انتخاب شد.

روش‌ها: ویژگی‌های مورفولوژیکی و بیوشیمیایی با استفاده از کتاب برجی و سیستماتیک باکتری‌ها انجام شد. آنالیزهای افتراقی با انجام تست‌های کاتالاز، گرم، TSI، سیمون سترات، اورنیتیل دکربوکسیلاز، لیزین دکربوکسیلاز، VP، MR، ایندول و SIM انجام شد. غربالگری اولیه جهت جداسازی ایزوله‌های تولید کننده آنزیم آمیلاز به ترتیب، با انجام آزمایش‌های پلیت حاوی نشاسته و دی‌نیتروسالیسیلیک اسید (DNS) صورت گرفت. جهت بهینه سازی تولید آنزیم آمیلاز در ایزوله برتر (SS1) با استفاده از محیط کشت M1 حاوی غلظت‌های مختلف NaCl (۲ تا ۱۴ درصد) انجام شد. برای یافتن pH بهینه از محیط کشت M1 با pH های مختلف ۴ تا ۸ استفاده شد و پس از گذشت زمان انکوباسیون فعالیت آمیلازی آنها مورد آزمایش قرار گرفت. ایزوله SS1 در محیط کشت M1 در ۲۸ درجه سانتیگراد به مدت ۷ روز جهت تهیه توده سلولی مناسب برای استخراج DNA کشت داده شد. استخراج DNA با استفاده از کیت استخراج DNA از باکتری‌های گرم مثبت، انجام شد. تکثیر ژن 16S rRNA با استفاده از DNA استخراج شده و آغازگرهای F27 و R1492 انجام شد. محصول PCR بدست آمده توالی یابی شده و توالی‌ها مورد بررسی قرار گرفت. توالی ژن 16S rRNA بدست آمده با استفاده از نرم‌افزار BLAST موجود در داده پایگاه ژنی NCBI همردیف شد و در سطح جنس با استفاده از نرم افزار CLUSTAL-X شناسایی شد. درخت فیلوژنی با استفاده از نرم‌افزار MEGA 6.06 و روش Neighbor-Joining رسم گردید. صحت درخت فیلوژنی با بوت استرپ ۱۰۰۰ تکرار صورت گرفت.

یافته‌ها: آنالیزهای بیوشیمیایی نشان داد که هر سه ایزوله کاتالاز و گرم مثبت هستند و هیچکدام H₂S تولید نمی‌کنند. تمام ایزوله‌ها برای آزمایش‌های TSI، MR و VP منفی بودند. توالی‌های 16S rRNA بدست آمده از فعال‌ترین ایزوله تولید کننده

آنزیم آمیلاز نشان می‌دهد که این ایزوله متعلق به جنس باسیلوس می‌باشد. شرایط بهینه رشد و تولید آنزیم آمیلاز در ایزوله برتر به شرح زیر می‌باشد: غلظت ۱۲ درصد NaCl، دمای ۳۵ درجه سانتیگراد و pH ۱۲ می‌باشد. بیشترین فعالیت آمیلازی مشاهده شده در شرایط بهینه رشد ایزوله برتر مورد مطالعه ۱۰۹ واحد آنزیمی بود (هرواحد آنزیمی عبارتست از میزان آنزیمی که یک میکروگرم گلوکز را در یک دقیقه آزاد کند).

نتیجه‌گیری: نتایج نشان می‌دهند که تولید آنزیم به شرایط رشد باکتری بستگی دارد و در مطالعات بعدی لازم است ژن کدکننده آنزیم آمیلاز تکثیر و جهت تولید انبوه آنزیم در میزبان مناسب کلون شود.

مقدمه

باکتری‌های میکروارگانیسم‌های هستند، که در طبیعت به صورت‌های مختلفی دیده شده و کاربردهای مختلفی از جمله کاربردهای پزشکی صنعتی و اقتصادی دارند. آنها می‌توانند به عنوان عوامل عفونت و بیماری‌زایی یا به صورت فلور طبیعی در اندام‌های مختلف موجودات زنده موجود باشند و یا به صورت آزاد در محیط پیرامون به وفور وجود داشته باشند. اقیانوسها و دریاها ۷۰٪ از سطح کره زمین را تشکیل می‌دهند و دارای اکوسیستم‌های دریایی مختلفی نظیر بستر اعماق اقیانوس، صخره‌های مرجانی و سواحل می‌باشند. اکوسیستم‌های دریایی در مقایسه با جنگل‌های بارانی استوایی تنوع زیستی بالاتری دارند [۱، ۲]. میکروبیولوژی دریایی امروزه به صورت روزافزون مورد توجه محققان و دانشمندان مختلف قرار گرفته است و مهمترین دلیل آن وجود ترکیبات فعال زیستی موجود در این اکوسیستم وسیع است [۳-۵]. ثانویه به شمار می‌روند که در این میان باسیل‌ها دارای پتانسیل بالقوه و قوی در تولید متابولیت‌های ثانویه نظیر آنزیم‌ها، آنتی‌بیوتیک‌ها، مواد ضدسرطان، حشره‌کش‌ها و ترکیبات دیگر می‌باشند. کاربرد آنزیم‌ها به طور صنعتی از سال ۱۹۱۴ و در صنایع شوینده بوده که تا کنون نیز به صورت بسیار گسترده تر صورت می‌پذیرد [۶].

حیوانات و گیاهان دریایی مانند اسفنج‌ها، مرجان‌ها، کرم‌ها و جلبک‌ها میزبان گوناگون و فراوانی از میکروارگانیسم‌های همزیست می‌باشند. همزیست‌های دریایی ممکن است تولیدکنندگان واقعی باشند یا در بیوسنتز بعضی از محصولات طبیعی دریایی جدا شده از میزبان ارگانیسم دریایی شرکت کنند [۷]. از جمله این همزیستی‌ها می‌توان به روابط باکتری‌ها و اسفنج‌ها اشاره کرد، مانند باکتری *Halobacterium salinarum* MMD047 که از اسفنج دریایی *Fasciospongia cavernosa* ساحل شبه جزیره هند جدا شده و قادر به تولید موثر آنزیم آمیلاز می‌باشد [۸].

اسفنج‌ها (*Phylum Porifera*) به عنوان یکی از قدیمی‌ترین جانوران چند سلولی، ساده، بی‌مهرگان چسبیده هستند که به سطوح جامد در زیستگاه‌ها متصل می‌شوند [۹]. اسفنج‌ها تماس نزدیکی با میکروارگانیسم‌های مختلف مثل ویروس‌ها، باکتری‌ها، قارچ‌ها،

پروتوزوا و جلبک‌های تک سلولی ایجاد کرده‌اند که تعامل اسفنج-میکروب را چندین برابر کرده است [۱۰]. به طور کلی، این میکروارگانیسم‌ها توسط آب دریا به کوآنوسیت منتقل می‌شوند و سپس به داخل مزوهیل جا به جا شده و به وسیله ی فاگوسیتوز هضم می‌گردند. بسیاری از اسفنج‌ها حاوی کنسرسیوم میکروبی، در داخل ماتریکس مزوهیل خود هستند که ممکن است به مقدار، نزدیک به نیمی از زیست توده خود را تشکیل بدهد [۱۱، ۱۲]. جوامع میکروبی اسفنج نماینده یکی از پیچیده‌ترین همزیستی بر روی زمین است [۱۱]. توزیع میکروبی در اسفنج‌ها به دنبال یک الگوی کلی با میکروارگانیسم‌های فعال فتوسنتزی مثل سیانوباکتری‌ها در لایه‌های بیرونی واقع در معرض نور است در حالی که باکتری‌های هتروتروف و احتمالاً اتوتروف ساکن هسته‌ی داخلی هستند [۱۳].

روش‌های مختلفی برای جداسازی این میکروارگانیسم‌ها وجود دارد. در تمامی روش‌های مرسوم فاکتورهای نظیر محیط کشت مناسب، شرایط کشت و تشخیص کلونی‌های کاندید در جداسازی اولیه منبع، غربالگری، آزمونهای بیوشیمیایی و رنگ آمیزی گرم لحاظ شده است. بعضی از محققان تیمارهایی را روی رسوبات از جمله خشک کردن و گرما دادن، جهت تحریک جداسازی باسیل‌های نادر بکار می‌برند [۱۴].

چندین آنزیم مانند آمیلاز، استیل کولین استراز و غیره از باکتری‌ها و قارچ‌های همزیست با اسفنج‌های دریایی و جلبک‌ها جدا شده‌اند. تولید آنزیم‌های صنعتی از جمله آمیلاز، اورناز توسط باکتری‌های جدا شده از موجودات زنده ساکن دریا (اسفنج‌ها، نرم‌تنان، مرجان‌ها و جلبک‌ها) صورت می‌پذیرد [۵، ۱۵]. آنزیم‌های باکتریایی دریایی برای استفاده‌های صنعتی چندین مزیت دارند، تعداد زیادی از میکروب‌های هالوفیل و هالوتولوانت در ساحل‌های نمکی به عنوان تولیدکننده‌های بالقوه ی آنزیمی و مولکول‌های دارویی مورد بررسی قرار گرفته‌اند. این میکروارگانیسم‌ها می‌توانند درجه حرارت‌های بالا، تابش شدید خورشید و شوری بالا را تحمل کنند. آنزیم‌های با منبع میکروبی به صرفه‌تر و بهتر از آنزیم‌های با منبع گیاه و حیوان هستند زیرا برای تولید ارزان‌تر، راحت‌تر و قابل اطمینان‌تر می‌باشند [۱۶-۲۲]. هدف از این مطالعه ارزیابی توانایی و میزان تولید آنزیم آمیلاز در سویه‌های باسیلوس همزیست با اسفنج‌های دریایی و بهینه‌سازی شرایط تولید در ایزوله برتر می‌باشد.

روش پژوهش

۱. نمونه برداری و آماده سازی نمونه ها

۱-۱ نمونه برداری

نمونه های اسفنج از دریای بوشهر و با منطقه جغرافیایی با ۲۷ درجه و ۱۴ دقیقه عرض شمالی و ۵۰ درجه و ۶ دقیقه طول شرقی، فروردین ماه ۹۷، جمع آوری شده اند.

۲-۱ جداسازی ایزوله های باکتری

برای جداسازی باکتریها از اسفنج های دریایی، محیط کشت M1 [۲۳] و همچنین، روش های رقت سازی متوالی و روش های پیش تیمار (انکوباسیون در دمای ۵۵ درجه سانتی گراد به مدت ۶ دقیقه [۲۴] خشک شدن در آن با دمای ۱۲۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت [۶] و تلفیقی از دو روش قبل) استفاده گردید. چند هاون استریل همراه با دسته، تیغه اسکالپل، لوله های آزمایش و آب دریای استریل به طور جداگانه برای هموژن هر کدام از اسفنج ها و رقت سازی، مورد استفاده قرار گردید، به این طریق که تمام نمونه های اسفنج را با آب دریای استریل برای حذف باکتری هایی که آزادانه به سطح بیرونی اسفنج ها متصل اند، شستشو داده و بعد با تیغه اسکالپل به قطعات ۱ سانتی متر مکعبی، برش داده شدند و درون هاون استریل با ده حجم از آب دریای استریل با دسته استریل، هموژن شدند تا سوسپانسیون غلیظ و یکدستی به دست آمد و بعد از آن، ضایعات بافتی اسفنج هموژن نشده، دور ریخته شدند و از سوسپانسیون باقی مانده، رقت های مختلف در سری های ۱۰ برابر (۱-۱۰، ۱۰-۲، ۱۰-۳، ۱۰-۴ تا ۱۰-۱۰) درون لوله های آزمایش با آب دریای استریل، تهیه گردید. ۱۰۰ میکرولیتر از هر رقت در محیط کشت M1 کشت داده شد [۲۵]. پیرای جلوگیری از رشد باکتری های گرم منفی سریع الرشد و قارچ ها به ترتیب ۲۵ میکروگرم/ میلی لیتر نالیدیکسیک اسید و ۲۵ میکروگرم/ میلی لیتر نیستاتین به محیط کشت ها اضافه گردید [۲۳]. بعد از تلقیح، همه پلیت ها در انکوباتور با دمای ۳۰ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ تا ۶۰ روز انکوبه شدند. در تحقیق حاضر، به جای آب مقطر، از آب دریا استفاده شد و در صورت نبود آب دریای طبیعی، از آب دریای مصنوعی (۲۶/۵۲ گرم NaCl، ۵/۲۲۸ گرم 6H2OMgCl2، ۳/۳۰۵ گرم MgSO4، ۱/۱۴۱ گرم CaCl2، ۰/۷۲۵ گرم KCl، ۰/۲۰۲ گرم NaHCO3، ۰/۰۸۳ گرم NaBr و ۱ لیتر آبدو بار تقطیر) [۲۶] استفاده می شد. بعد از شناسایی مورفولوژی، شناسایی بیوشیمیایی توسط انواع تست های کاتالاز، MR-VP، سیمون سترات، SIM، TSI، لایزین دکربوکسیلاز و ارنیتین دکربوکسیلاز انجام گرفت.

۲. شناسایی ایزوله های جدا شده

۱-۲ استخراج DNA ژنومی و PCR

DNA اکتینومیست SS1 با استفاده از کیت استخراج DNA باکتری های گرم مثبت Cat. No. PR881614Cinna pure DNA استخراج گردید. واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) F۲۷ و (GGTTACCTTGTTACGACTT) R۱۴۹۲، مواد مورد استفاده و شرایط واکنش PCR به ترتیب زیر می باشد. مقدار یک میکرولیتر (۱۰ نانوگرم) از DNA استخراجی در تهیه محلول PCR استفاده شد. جهت تهیه محلول PCR، یک میکرولیتر از DNA استخراجی، دو میکرولیتر از هر یک از پرایمرها (۱۰ پیکومول)، ۰/۵ میکرولیتر dNTP (۱۰ میلی مولار)، ۰/۵ میکرولیتر Taq پلمراز (۵۰/μ)، ۲/۵ میکرولیتر بافر 10X PCR و یک میکرولیتر MgCl2 (۵۰ میلی مولار) استفاده شد و در نهایت حجم محلول با آب مقطر به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. با استفاده از دستگاه ترموسایکلر و طبق پروتکل دمایی واسرشت سازی اولیه ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۲ دقیقه واسرشت سازی ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۲ دقیقه اتصال ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، بسط ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۴۵ ثانیه برای ۳۰ چرخه و بسط نهایی ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه بود.

۲-۲ توالی یابی قطعه تکثیر یافته

محصولات PCR مطلوب با باندهای مورد نظر جهت توالی یابی به شرکت ماکروژن کره ارسال شدند. روش تعیین توالی، روش سنجر و توالی یابی به صورت کاپیلاری و با استفاده از دستگاه ABI مدل آن ۳۷۳۰XL صورت گرفت.

۳-۲ آنالیز داده های مولکولی

کروماتوگرام های بدست آمده از توالی یابی ابتدا به وسیله نرم افزار Chromes بررسی و ویرایش شدند. پس از آن توالی های به دست آمده در پایگاه اطلاعات زیستی با استفاده از برنامه Blast با توالی های ثبت شده در پایگاه همردیف و شناسائی شد. برای رسم درخت فیلوژنی از نرم افزار MEGA6 استفاده گردید. به این صورت که توالی های DNA گونه های مشابه یا نزدیک با نمونه مورد مطالعه از پایگاه داده های ژنتیکی استخراج شد و به همراه توالی های DNA مورد مطالعه وارد این نرم افزار شدند.

۳. بررسی فعالیت آنزیم آمیلاز

۱-۳ مقایسه کیفی ایزوله‌ها در تولید آنزیم آمیلاز

جهت تست فعالیت آمیلازی ابتدا ایزوله‌های باکتریایی به صورت خطی بر روی محیط M1 کشت داده شدند. پس از ۷۲ ساعت بر روی خط کشت ها لوگل ریخته شد. ایزوله‌هایی که دارای آنزیم آمیلاز فعالی هستند بر روی محیط فعالیت بهتری از خود نشان داده و اطراف خط کشت میکروبی هاله ای شفاف ایجاد کرده بودند.

۲-۳ بهینه سازی شرایط تولید آنزیم آمیلاز

پس از انتخاب گونه مقدار آنزیم آمیلاز در واحد زمان اندازه گیری و شرایط تولید حداکثری آنزیم بررسی شد. ۱ الی ۲ کلونی مستقیماً به ۵۰ میلی لیتر محیط پایه (سوکروز ۰/۲٪، پپتون ۰/۳۵٪ و عصاره مالت ۰/۱۵٪) تلقیح شد. پس از آن محیط کشت بر روی شیکر با سرعت ۱۵۰ rpm در دمای ۲۸ درجه سانتیگراد قرار داده شد. هر ۱۲ ساعت یک بار OD محیط کشت در مقابل محیط کشت پایه در طول موج ۵۷۸ نانومتر اندازه گیری شد.

برای تعیین شرایط بهینه رشد ابتدا محیط پایه ای با درصدهای نمک (NaCl) ۲، ۶، ۱۰، ۱۲ و ۱۴ ساخته و با تلقیح باکتری منتخب رشد باکتری با اندازه گیری OD ها بررسی شد. در مرحله بعد برای سنجش مقدار OD های حاصله از رشد باکتری، محیط پایه ای با درصد نمک ۱۲ و در چهار pH ۴، ۶، ۸ و ۱۰ ساخته شد. آزمایشات به همان صورت گفته شده در قبل برای ارلن های ۵۰ میلی لیتر حاوی محیط پایه با pH های مختلف صورت پذیرفت و OD ها همگی ثبت شد. با توجه به اینکه در pH=۶ بالاترین OD رشد باکتری ثبت شد برای سنجش مرحله بعدی یعنی ارزیابی رشد باسیل منتخب در دماهای مختلف محیط پایه ای با غلظت نمک ۱۲ درصد و pH=۶ ساخته شد. حال محیط ساخته شده در دماهای مختلف مورد بررسی قرار گرفت. OD رشد دماهای ۲۰، ۲۸، ۳۵ و ۴۰ درجه سانتیگراد جمع آوری و ثبت گردید. جهت سنجش تولید آنزیم آمیلاز در شرایط بهینه رشد نمونه باکتری به صورت مستقیم درون ۵۰ میلی لیتر محیط کشت مایع بهینه و دمای مطلوب تلقیح و بر روی شیکر با سرعت ۱۵۰ rpm قرار گرفت. پس از آن هر ۱۲ ساعت یکبار مقدار ۲ میلی لیتر از محیط جمع آوری شد OD آن اندازه گیری و سپس برای انجام آزمایش سنجش آنزیم آمیلاز با دور (rpm) ۴۵۰۰ سانتریفیوژ شد.

۳-۳ تعیین فعالیت آنزیم آمیلاز به روش کمی

در تمامی آزمایشات سنجش فعالیت آنزیم، دو لوله آزمایش یکی به عنوان شاهد و دیگری به عنوان آزمون انتخاب شد، سپس مراحل کاری به ترتیب زیر انجام شد: در هر دو لوله ۱ میلی لیتر از محلول

نشاسته ۰/۱٪ به عنوان سوبسترای آنزیم ریخته شد. در لوله تست ۰/۵ میلی لیتر نمونه آنزیمی و در لوله شاهد ۰/۵ سی سی آب مقطر ریخته شد. به هر دو لوله ۰/۵ میلی لیتر بافر سیترات ۰/۵ مولار با pH=۴/۸ اضافه شد. نمونه ها به مدت ۵ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد در بن ماری انکوبه شدند. برای انجام واکنش آنزیمی ۲ میلی لیتر معرف DNS اضافه شد. لوله ها به مدت ۱۰ دقیقه در آب جوش قرار داده شدند تا در اثر احیا معرف DNS توسط قند احیا شده (گلوکز)، تغییر رنگ معرف از زرد به قرمز ایجاد شود. ۱ میلی لیتر محلول تارتارات مضاعف سدیم و پتاسیم ۰/۴٪ برای پایداری رنگ محیط اضافه شد. جذب نوری در طول موج ۵۷۸ نانومتر خوانده و نتایج ثبت شد. اختلاف جذب بین لوله شاهد و لوله تست بیانگر میزان قند احیا کننده به وجود آمده از فعالیت آنزیم آمیلاز در طی مدت واکنش است.

۳-۴ رسم منحنی رشد شناسایی شده

ارلن حاوی محیط کشت برای هوادهی بیشتر بر روی شیکر و با دور ۱۵۰ و در دمای ۲۸ درجه سانتیگراد قرار داده شد. بعد از آن هر ۱۲ ساعت یکبار مقدار ۲ میلی لیتر از محیط کشت بوسیله یک پیپت استریل برداشته شد و جذب نوری آن در طول موج ۵۷۸ نانومتر اندازه گیری شد.

۳-۵ تهیه منحنی استاندارد گلوکز در طول موج ۵۷۸ نانومتر

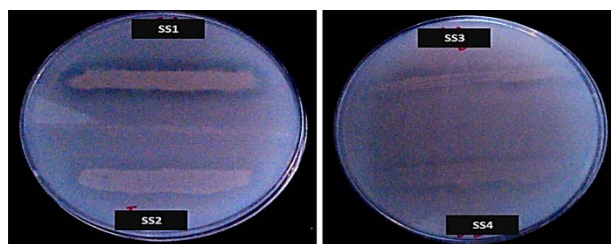
ترسیم منحنی استاندارد گلوکز در طول موج ۵۷۸ نانومتر جهت محاسبه میزان گلوکز حاصله از فعالیت آنزیم آمیلاز ضروری است. پس از تهیه محلول ۱۰۰ میلی مولار گلوکز از آن به عنوان محلول اصلی در تهیه محلول های صفر، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۸۰ و ۱۰۰ میلی مولار استفاده می شود. محلول صفر دارای تنها بافر سیترات ۰/۵ مولار با pH ۴/۸ باشد. حجم هر لوله با استفاده از همین بافر به ۱۰ میلی لیتر رسیده سپس ۲ میلی لیتر معرف DNS به هر لوله افزوده شده و لوله ها در بن ماری جوش به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شدند. پس از سرد شدن لوله ها میزان جذب نوری خوانده شد.

۴. آنالیز داده‌ها

۴-۱ آنالیز داده‌های مولکولی

کروماتوگرام های بدست آمده از توالی یابی ابتدا به وسیله نرم افزار Chromes بررسی و ویرایش شدند.

پس از آن توالی بدست آمده در پایگاه اطلاعات زیستی با استفاده از برنامه Blast با توالی های ثبت شده در پایگاه همردیف و شناسایی شد. برای رسم درخت فیلوژنی از نرم افزار MEGA6 استفاده گردید.



شکل ۲: آنالیز کیفی ایزوله های جدا شده از اسفنج های دریایی با استفاده از روش آنالیز پلیت

Fig.2: qualitative estimation of isolated strain from marine sponges for amylase activity, plate assay method was used

ویژگیهای ظاهری سه ایزوله انتخاب شده در شکل ۱ آمده است. نتایج آزمونهای بیوشیمیایی سه ایزوله انتخاب شده نشان داد که هر سه ایزوله برای آزمونهای گرم، TSI و کانالاز مثبت بودند و برای سایر تستها منفی بودند (جدول ۴).

جدول ۴: نتایج آزمون های بیوشیمیایی

Table 4: Biochemical assay results

Sample	SS1	SS2	SS3
Gram	+	+	+
TSI	+	+	+
catalase	+	+	+
MR	-	-	-
VP	-	-	-
Ornithine decarboxylase	-	-	-
Simmoncitrate	-	-	-
H2S	-	-	-
Motility	-	-	-
Indol	-	-	-

نتایج کشت جدایه SS1 در غلظت های مختلف نمک: پس از کشت جدایه SS1 در محیط پایه ای با غلظت های ۲، ۶، ۱۰، ۱۲ و ۱۴ درصدی نمک نتایج بدست آمد که در آن بیشترین رشد جدایه مورد نظر در نمک ۱۲٪ ثبت شد (شکل ۳).

نتایج کشت جدایه SS1 در pH مختلف: نتایج بدست آمده از کشت ایزوله SS1 در محیط پایه ای با pH ۴، ۶ و ۸ نشان می دهد، بیشترین میزان تولید آنزیم در pH ۶ به دست آمد (شکل ۴).

میزان رشد ایزوله SS1 و تولید آنزیم آمیلاز در شرایط بهینه (pH ۶ و غلظت نمک ۱۲٪) در زمانهای مختلف اندازه گیری شد نتایج حاصله نشان داد بیشترین مقدار تولید آمیلاز ۱۶ ساعت پس از کشت و برابر با ۱۰۹ واحد آنزیمی است در حالیکه بیشترین میزان رشد باکتری ۲۲ ساعت پس از کشت بدست آمد (شکل ۵).

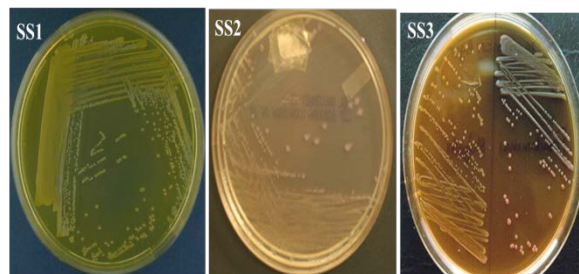
۴-۲ آنالیز داده های رشد

داده های حاصل از آزمایش های رشد و تولید آنزیم آمیلاز با استفاده از اکسل ۲۰۱۰ رسم و آنالیز شده است.

نتایج و بحث

در بیوتکنولوژی، پروتئوباکتری ها، اکتینوباکتری ها و فیرمیکوت ها مانند سودوویبریو [۲۷، ۲۸]، استرپتومایسس [۲۹، ۳۰] و باسیلوس [۳۱] عمده ترین شاخه های همزیست با اسفنج های دریایی هستند که منبع اصلی جداسازی و شناسایی آنزیمها، ترکیبات زیست فعال ثانویه محسوب می شوند. گونه های باسیلوس بعنوان یکی از تولید کننده های عمده ترکیبات زیست فعال ثانویه شناخته شده است [۳۲]. از باسیلوسهای همزیست با اسفنج ها طیف متنوعی از ترکیبات ضدباکتری، ضدقارچی، به همراه آنزیم های متنوع، مهارکننده ها، بیوسورفاکتانت و ترکیبات سیتوتوکسیک جداسازی شده است [۳۳-۳۵].

جداسازی و شناسایی جدایه های باسیل های جدا شده از اسفنج های دریایی بوشهر براساس خصوصیات ظاهری و بیوشیمیایی آنها: در مجموع بعد از ۶۰ روز ۲۵ کلونی مختلف بدست آمد و مجدداً برای خالص سازی کشت داده شدند. ایزوله های باکتریهای دریایی از منطقه جداسازی شده با توجه به شکل کلونی، رنگ میسیلیوم و رنگیزه های تولیدی از یکدیگر تفکیک شدند (شکل ۱).



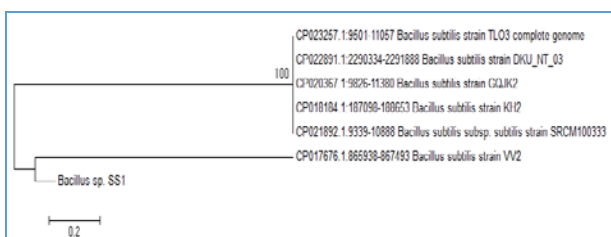
شکل ۱: ایزوله های جدا شده از اسفنج های دریایی. به ترتیب از چپ به راست SS1 و SS2، SS3

Fig.1: Bacteria strain isolated from marine sponges. From left to right, SS1, SS2 and SS3, respectively.

ایزوله های بدست آمده براساس فعالیت آنزیمی کیفی آمیلازی سه ایزوله SS1، SS2 و SS3 انتخاب شدند (شکل ۲). همانگونه که در شکل ۲ مشاهده می شود ایزوله SS1 بیشترین هاله شفاف را نشان میدهد. اندازه هاله شفاف اطراف باکتری میزان فعالیت آمیلازی را نشان می دهد (شکل ۲).

۱. شناسایی مولکولی جدایه SS1 و رسم درخت فیلوژنی:

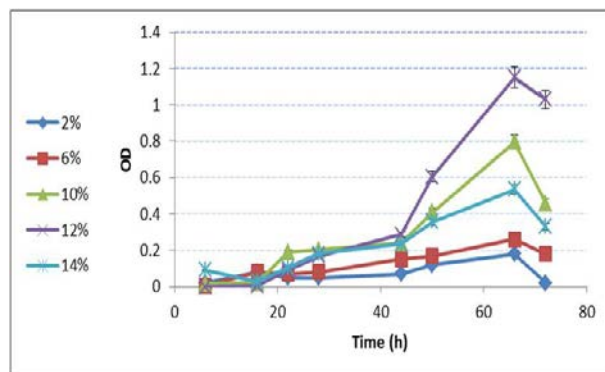
ژن 16S rRNA با استفاده از DNA ژنومی و آغازگرهای عمومی مربوطه توسط PCR تکثیر شد. طول قطعه تکثیر قطعه DNA در محدوده ۱۵۰۰ جفت باز می باشد. توالی محصول PCR با توالی های ثبت شده در بانک ژنی مقایسه گردید. نتایج رسم درخت فیلوژنی گونه مورد مطالعه و مقایسه با گونه های مشابه در بخشی از تحقیق حاضر، روابط فیلوژنی بین گونه های باسیل با استفاده از ژن 16S rRNA مورد بررسی قرار گرفت. همانگونه که در شکل ۶ مشاهده می شود ایزوله مورد مطالعه با بوت استرپ ۱۰۰ از جنس باسیلوس می باشد. و بیشترین شباهت را با گونه *B. subtilis strain w2* دارد (شکل ۶).



شکل ۶: درخت فیلوژنی ایزوله SS1 بر اساس توالی 16S rRNA با استفاده از روش Neighbor-Joining و بوت استرپ ۱۰۰۰

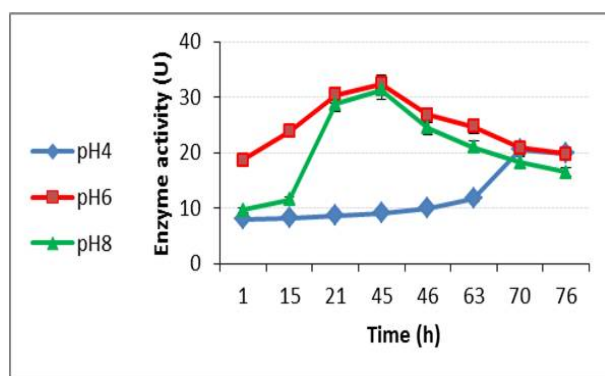
Fig.6: Phylogenetic tree of SS1 isolate based on 16S rRNA gene sequence, using Neighbor-Joining method and bootstrap 1000.

مطالعه ای که توسط Annamalai و همکارانش در سال ۲۰۱۱ [۳۶] گزارش کردند از ترشح آمیلاز در ایزوله باسیلوس جدا شده از سواحل دریای هند بهینه شرایط تولید این آنزیم در pH 9 می باشد درحالیکه در مطالعه حاضر بهینه شرایط تولید آنزیم در گونه SS1، pH=6 می باشد. این اختلاف در شرایط بهینه می تواند مربوط به نوع گونه، منطقه جغرافیایی نمونه برداری و شرایط انجام آزمایش باشد. PH یکی از مهمترین عوامل تعیین کننده رشد و مورفولوژی میکروارگانیسم ها می باشد زیرا میکروارگانیسم ها به غلظت یون های هیدروژن موجود در محیط حساس هستند. در سنتز و ترشح آمیلاز تاثیر می گذارد. Indira در سال ۲۰۱۲ با بررسی بر روی تعدادی از باسیل های گروه *B. cereus* مشاهده کردند این باکتری ها می توانند در 10% NaCl، pH 9، و بصورت بهینه آنزیم آمیلاز تولید کنند [۳۷]. Bandal و همکاران در سال ۲۰۲۱ [۳۸] با استفاده از روشهای آماری شرایط بهینه تولید آنزیم آمیلاز در سویه *Bacillus sp.* مشاهده کردند این باکتری در شرایط 9، pH 5.5 % NaCl بیشترین میزان تولید آنزیم آمیلاز را داشته باشد [۳۶]. با توجه به اینکه تنها اختلاف در شرایط بهینه با مطالعه حاضر اختلاف در میزان درصد نمک NaCl است این اختلاف را می توان به غلظت نمکی بالای محیط زیست خلیج فارس که سویه مورد مطالعه ما از آن جداسازی شده است ارتباط داد. همچنین Khusro



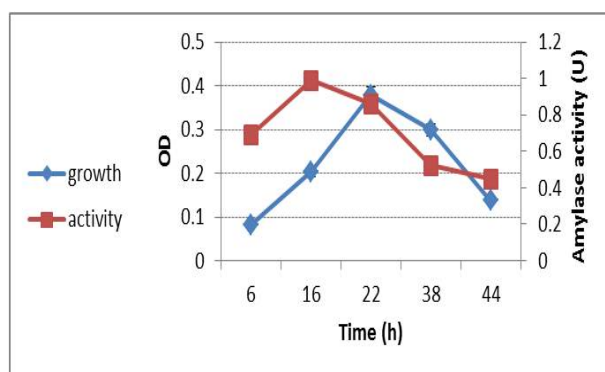
شکل ۳: منحنی مقایسه ای رشد ایزوله SS1 در غلظت های مختلف ۲، ۶، ۱۰، ۱۲ و ۱۴ درصدی نمک، هر آزمایش با سه تکرار انجام شده است. میله خط انحراف معیار را نشان می دهد.

Fig.3: Effect of NaCl on growth rate of SS1 isolate using 2,6,10,12 and 14% NaCl concentration. Error bars represent standard deviation.



شکل ۴: منحنی مقایسه ای رشد SS1 در PH مختلف هر آزمایش با سه تکرار انجام شده است. میله خط انحراف معیار را نشان می دهد.

Fig.4: Effect of pH on growth rate of SS1 isolate using pH 2,6 and 8. Each experiment repeated 3 times and error bars represent standard deviation.



شکل ۵: مقایسه منحنی رشد و مقدار تولید آنزیم آمیلاز در زمان های مختلف در ایزوله SS1

Fig.5: Effect of time on growth rate and enzyme activity of SS1 isolate.

با فرمت مجله، نگارش و جمع‌آوری مطالب، ترجمه و ویراستاری مقالات و هماهنگی محتوایی مقاله را نیز بر عهده داشته است. تمرکز اصلی نویسنده دوم (سعیده شاکری) بر بخش انجام مراحل آزمایش و تمرکز اصلی نویسنده سوم (نبی جمعه زاده) نظارت و کمک به بخش میکروبی و جداسازی سویه باکتریایی را برعهده داشته است.

تشکر و قدردانی

کار حاصل طرح مصوب داخلی به شماره ۱۴۳ که شایسته است مراتب قدردانی خود را از دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر و همچنین از سردبیر و مدیر داخلی محترم نشریه اقیانوس‌شناسی جناب آقای دکتر اکبرپور و تیم ایشان اعلام دارم.

تعارض منافع

«هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.»

References

- Xie F, Quan S, Liu D, Ma H, Li F, Zhou F, et al. Purification and characterization of a novel α -amylase from a newly isolated *Bacillus methylotrophicus* strain PII-2. *Process Biochem.* 2014;49:47-53. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2013.09.025>
- Safahieh A, Lamoochi R, Salamat N, Abyar H. Isolation and Identification of *Bacillus firmus* from the Marine Sediments of Imam Khomeini Port and Study Its Ability in Biosorption of Lead. *JOC.* 2014;5(17):11-9.
- Alijani H, Matroodi S, Sharafi A, Zamani I. Antimicrobial Activity and Molecular Identification of *Nocardiosis* sp. *AHA2* from Deylam Nearshore Sediments. *JOC.* 2019;9(36):23-9.
- umar GS, Chandra MS, Mallaiah KV, Sreenivasulu P, Choi YL. Purification and characterization of highly thermostable α -amylase from thermophilic *Alicyclobacillus acidocaldarius*. *Biotechnol Bioprocess Engineer.* 2010;15:435-40. <http://dx.doi.org/10.1007/s12257-009-0072-5>
- Blunt JW, Copp BR, Hu WP, Munro MH, Northcote PT, Prinsep MR. Marine natural products. *Nat Prod Rep.* 2007;24(1):31-86. <http://dx.doi.org/10.1039/b603047p> <http://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17268607>
- Bredholt H, Fjaervik E, Johnsen G, Zotchev SB. Actinomycetes from sediments in the Trondheim fjord, Norway: diversity and biological activity. *Mar Drugs.* 2008;6(1):12-24. <http://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18648671>
- Lee YK, Lee JH, Lee HK. Microbial Symbiosis in Marine Sponges. *J Microbiol.* 2000;39.
- Santhanam S, Kiran S, Selvin J, Gandhimathi R, Baskar T, Manilal A, et al. Optimization, production, and partial characterization of an alkalophilic amylase produced by sponge associated marine bacterium *Halobacterium salinarum* MMD047. *Biotechnol Bioprocess Engineer.* 2010;14:67-75. <http://dx.doi.org/10.1007/s12257-008-0060-1>
- Abdelmohsen UR, Pimentel-Elardo SM, Hanora A, Radwan M, Abou-El-Ela SH, Ahmed S, et al. Isolation, phylogenetic analysis and anti-infective activity screening of marine sponge-associated actinomycetes. *Mar Drugs.* 2010;8(3):399-412. <http://dx.doi.org/10.3390/md8030399> <http://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20411105>
- Webster NS, Taylor MW. Marine sponges and their microbial symbionts: love and other relationships. *Environ Microbiol.* 2012;14(2):335-46. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02460.x> <http://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21443739>
- Taylor MW, Radax R, Steger D, Wagner M. Sponge-associated microorganisms: evolution, ecology, and biotechnological potential. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2007;71(2):295-347. <http://dx.doi.org/10.1128/MMBR.00040-06> <http://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17554047>
- Hentschel U, Usher KM, Taylor MW. Marine sponges as microbial fermenters. *FEMS Microbiol Ecol.* 2006;55(2):167-77.

نتیجه‌گیری

با توجه به اهمیت زیاد باسیل‌ها در تولید انواع گسترده‌ای از متابولیت‌های ثانویه و نیز استفاده‌های دارویی وسیع، خلاء مطالعه دقیق و شناسایی گونه‌های باسیل در منطقه بسیار احساس می‌شود. شناسایی باکتری‌ها علاوه بر حفظ و حراست تنوع زیستی شان راه را برای استفاده‌های بیوتکنولوژی و بهره‌وری اقتصادی باز کند.

مشارکت نویسندگان

در نگارش این مقاله نویسندگان سهم یکسانی داشتند. تمرکز اصلی نویسنده اول (سهیلا مطرودی) که نویسنده مسئول مقاله است بیشتر بر یافتن روش‌ها، آنالیز داده‌ها و نگارش مقاله. نظارت بر انطباق مقاله

- <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6941.2005.00046.x>
<http://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16420625>
13. Hentschel U, Hopke J, Horn M, Friedrich AB, Wagner M, Hacker J, et al. Molecular evidence for a uniform microbial community in sponges from different oceans. *Appl Environ Microbiol.* 2002;68(9):4431-40.
<http://dx.doi.org/10.1128/AEM.68.9.4431-4440.2002>
<http://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12200297>
 14. Kumar PS, Raj JP, Durai pandiyan V, Ignacimuthu S. Antibacterial activity of some actinomycetes from Tamil Nadu, India. *Asian Pacific J Tropical Biomed.* 2012;2(12):936-43. [http://dx.doi.org/10.1016/S2221-1691\(13\)60003-9](http://dx.doi.org/10.1016/S2221-1691(13)60003-9)
 15. Dumorné K, Severe R. Marine enzymes and their industrial and biotechnological applications. *Minerva Biotechnol.* 2018;30:113-9.
<http://dx.doi.org/10.23736/S1120-4826.18.02442-4>
 16. Kumar V, Bharti A, Negi YK, Gusain O, Pandey P, Bisht GS. Screening of actinomycetes from earthworm castings for their antimicrobial activity and industrial enzymes. *Braz J Microbiol.* 2012;43(1):205-14. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-838220120001000022>
<http://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24031819>
 17. Nisha M, Satyanarayana T. Characterization and multiple applications of a highly thermostable and Ca(2)(+)-independent amylopullulanase of the extreme thermophile *Geobacillus thermoleovorans*. *Appl Biochem Biotechnol.* 2014;174(7):2594-615.
<http://dx.doi.org/10.1007/s12010-014-1212-8>
<http://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25267353>
 18. Dash BK, Rahman MM, Sarker PK. Molecular Identification of a Newly Isolated *Bacillus subtilis* BI19 and Optimization of Production Conditions for Enhanced Production of Extracellular Amylase. *Biomed Res Int.* 2015;2015:859805.
<http://dx.doi.org/10.1155/2015/859805>
<http://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26180814>
 19. Khusro A, Barathikannan K, Aarti C, Agastian P. Optimization of thermo-alkali stable amylase production and biomass yield from *Bacillus* sp. under submerged cultivation. *Fermentation.* 2017;3:1-19.
<http://dx.doi.org/10.3390/fermentation3010007>
 20. Raveendran S, Parameswaran B, Ummalyma SB, Abraham A, Mathew AK, Madhavan A, et al. Applications of Microbial Enzymes in Food Industry. *Food Technol Biotechnol.* 2018;56(1):16-30. <http://dx.doi.org/10.17113/ftb.56.01.18.5491>
<http://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29795993>
 21. Bhavtosh A, Kikani SK, Upasna R. Stability, Thermodynamic Attributes of Starch Hydrolyzing α -Amylase of *Anoxybacillus rupiensis* TS-4, Starch - Stärke. 2019;72:1-2.
<http://dx.doi.org/10.1002/star.201900105>
 22. Trabelsi S, Ben Mabrouk S, Kriaa M, Ameri R, Sahnoun M, Mezghani M, et al. The optimized production, purification, characterization, and application in the bread making industry of three acid-stable alpha-amylases isoforms from a new isolated *Bacillus subtilis* strain US586. *J Food Biochem.* 2019;43(5):e12826.
<http://dx.doi.org/10.1111/jfbc.12826>
<http://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31353531>
 23. Abdelmohsen UR, Yang C, Horn H, Hajjar D, Ravasi T, Hentschel U. Actinomycetes from Red Sea sponges: sources for chemical and phylogenetic diversity. *Mar Drugs.* 2014;12(5):2771-89.
<http://dx.doi.org/10.3390/md12052771>
<http://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24824024>
 24. Gontang EA, Fenical W, Jensen PR. Phylogenetic diversity of gram-positive bacteria cultured from marine sediments. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73(10):3272-82.
<http://dx.doi.org/10.1128/AEM.02811-06>
<http://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17400789>
 25. Sarilmiser K, Toksoy H, Oner E. Investigation of anti-cancer activity of linear and aldehyde-activated levan from *Halomonas smyrnensis* AAD6T. *Biochem Engineer J.* 2014;92:28-34.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2014.06.020>
 26. Sun H, Liu Z, Zhao H, Ang EL. Recent advances in combinatorial biosynthesis for drug discovery. *Drug Des Devel Ther.* 2015;9:823-33.
<http://dx.doi.org/10.2147/DDDT.S63023>
<http://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25709407>
 27. O'Halloran JA, Barbosa TM, Morrissey JP, Kennedy J, O'Gara F, Dobson AD. Diversity and antimicrobial activity of *Pseudovibrio* spp. from Irish marine sponges. *J Appl Microbiol.* 2011;110(6):1495-508.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05008.x>
<http://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21435124>
 28. Buijs Y, Bech PK, Vazquez-Albacete D, Bentzon-Tilia M, Sonnenschein EC, Gram L, et al. Marine Proteobacteria as a source of natural products: advances in molecular tools and strategies. *Nat Prod Rep.* 2019;36(9):1333-50.
<http://dx.doi.org/10.1039/c9np00020h>
<http://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31490501>
 29. Yang Z, He J, Wei X, Ju J, Ma J. Exploration and genome mining of natural products from marine *Streptomyces*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2020;104(1):67-76.
<http://dx.doi.org/10.1007/s00253-019-10227-0>
<http://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31773207>
 30. Jackson SA, Crossman L, Almeida EL, Margassery LM, Kennedy J, Dobson ADW. Diverse and Abundant Secondary Metabolism Biosynthetic Gene Clusters in the Genomes of Marine Sponge Derived *Streptomyces* spp. Isolates. *Mar Drugs.* 2018;16(2).
<http://dx.doi.org/10.3390/md16020067>
<http://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29461500>
 31. Phelan RW, Barret M, Cotter PD, O'Connor PM, Chen R, Morrissey JP, et al. Subtilomycin: a new lantibiotic from *Bacillus subtilis* strain MMA7 isolated from the marine sponge *Haliclona simulans*. *Mar Drugs.* 2013;11(6):1878-98.

- <http://dx.doi.org/10.3390/md11061878>
<http://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23736764>
32. Ortiz A, Sansinenea E. Chemical Compounds Produced by Bacillus sp. Factories and Their Role in Nature. *Mini Rev Med Chem.* 2019;19(5):373-80.
<http://dx.doi.org/10.2174/1389557518666180829113612> <http://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30156158>
33. Santos-Gandelman JF, Giambiagi-deMarval M, Oelemann WM, Laport MS. Biotechnological potential of sponge-associated bacteria. *Curr Pharm Biotechnol.* 2014;15(2):143-55.
<http://dx.doi.org/10.2174/1389201015666140711115033> <http://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25022270>
34. Indraningrat AA, Smidt H, Sijkema D. Bioprospecting Sponge-Associated Microbes for Antimicrobial Compounds. *Mar Drugs.* 2016;14(5).
<http://dx.doi.org/10.3390/md14050087>
<http://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27144573>
35. Laport MS. Isolating Bacteria from Sponges: Why and How? *Curr Pharm Biotechnol.* 2017;18(15):1224-36.
<http://dx.doi.org/10.2174/138920101966618032911327> <http://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29595106>
36. Annamalai N, Thavasi R, Vijayalakshmi S, Balasubramanian T. Extraction, Purification and Characterization of Thermostable, Alkaline Tolerant alpha-Amylase from Bacillus cereus. *Indian J Microbiol.* 2011;51(4):424-9.
<http://dx.doi.org/10.1007/s12088-011-0160-z>
<http://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23024403>
37. Indira S. Amylase produced by Bacillus sp. SI-136 isolated from sodic-alkaline soil for efficient starch desizing. *J Biochem Technol.* 2012;4:604-9.
38. Bandal JN, Tile VA, Sayyed RZ, Jadhav HP, Azelee NIW, Danish S, et al. Statistical Based Bioprocess Design for Improved Production of Amylase from Halophilic Bacillus sp. H7 Isolated from Marine Water. *Molecules.* 2021;26(10).
<http://dx.doi.org/10.3390/molecules26102833>
<http://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34064563>
39. Kuddus M, Ahmad IZ. Cold-active extracellular α -amylase production from novel bacteria Microbacterium foliorum GA2 and Bacillus cereus GA6 isolated from Gangotri glacier, Western Himalaya. *J Genetic Engineer Biotechnol.* 2012;10:151-9.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jgeb.2012.03.002>

AUTHOR(S) BIOSKETCHES

Matroodi, S., Department of Marine biology, Faculty of Marine Science and oceanography, Khorramshahr University of marine science and technology, Iran

✉ s.matroodi@kmsu.ac.ir

 0000-

Shakeri, S., Department of biology, Faculty of Science, Islamic Azad University Borujerd branch, Borujerd , Iran

✉ shakeri@yahoo.com



Jomehzadeh, N., Abadan University of Medical Sciences, Abadan, Iran

✉ jomezadeh@yahoo.com



HOW TO CITE THIS ARTICLE

Citation (Vancouver) Matroodi S, Shakeri, S, Jomehzadeh N. Optimization Amylase Production in Bacteria from Marine Sponges. *J Oceanography.* 2022; 12(48): 35-45.

 <http://doi.org/10.52547/joc.12.48.35>

 <http://joc.inio.ac.ir/article-1-1586-fa.html>

 <https://orcid.org/0000-0002-8311-5238>



COPYRIGHTS

©2021 The author(s). This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution (CC BY 4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, as long as the original authors and source are cited. No permission is required from the authors or the publishers.

