جداسازی انتخابی اکتینوباکتری‌های مرتبط با اسفنج‌های خلیج فارس و ارزیابی فعالیت سیتوتوکسیک و آنتی اکسیدانی متابولیت‌های آنها

محسن گذری[1*]، سعید تمدنی جهرمی[2]، سجاد پورمظفر[3]، محمود حافظیه[4]، سیامک بهزادی[5]

۱- پژوهشگر پسادکتری، پژوهشکده اکولوژی خلیج‌فارس و دریای عمان، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بندرعباس، ایران، پست الکترونیکی: M_gozari@yahoo.com

۲- استادیار پژوهشی، پژوهشکده اکولوژی خلیج‌فارس و دریای عمان، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بندرعباس، ایران، پست الکترونیکی: 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

۴- دانشیار پژوهشی، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران، پست الکترونیکی: jhafezieh@yahoo.com

۵- استادیار پژوهشی، پژوهشکده اکولوژی خلیج‌فارس و دریای عمان، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بندرعباس، ایران، پست الکترونیکی: 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 آنتی اکسیدان 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 آنتی اکسیدانی 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 مایکرودایلوشن 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 جدایه های اکتینوباکتری بیشترین فراوانی را ایجاد نمود. ۴۶ درصد از متابولیت‌های استخراج شده بیش از ۹۰ درصد رادیکال‌های آزاد DPPH را در محدوده IC50 از ۲۳۰/۱ µg/ml تا ۷۷۵/۳۴ مهار نمودند. در حالیکه ۴۴ درصد از متابولیت‌های استخراج شده بیش از ۹۰ درصد سلولهای آرتمیا را در محدوده LC50 از ۶۵/۱۵ µg/ml تا ۷۸۲/۳۲ 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، متابولیت های سیتوتوکسیک، تیمارهای انتخابی، مهار DPPH.*

۱. مقدمه

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. ارگانیسم‌های دریایی از قبیل اسفنج‌ها در مقابل تهدیدات زیستی پیرامون خود مانند شکارچیان، عوامل بیماریزا و عوامل چسبندگی زیستی (فولینگ) متابولیت-هایی با فعالیت‌های زیستی متنوع از جمله سیتوتوکسیک و آنتی اکسیدان تولید نموده و بدین ترتیب استراتژی دفاع شیمیایی خود را اعمال می‌نمایند (Helber et al., 2018) .

در این میان نقش میکروبیوم اسفنج‌ها از اهمیت ویژه ای 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 می توانند تا ۶۰ درصد بیومس اسفنج را در بر گیرند نظریه مذکور را تقویت می نماید (Hill et al., 2006). لیکن همچنان پاسخ قطعی به این سوال داغ و اساسی مستلزم پژوهش های گسترده از جمله مطالعه میکروبیوم اسفنج ها از قبیل باکتریهای مرتبط با آن می باشد.

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 اسفنج ها قابل کشت نمی‌باشند (Schirmer et Colwell and Grimes, 2000 ; al., 2005; Webster et al., 2001). از اینرو جداسازی آنها مستلزم بهینه‌سازی فرایندهای جداسازی انتخابی با توجه به زیستگاه بومی باکتریها می باشد. در گام بعدی فعالیت‌های زیستی آنها ارزیابی می‌گردد. اکتینوباکتری‌ها به عنوان مهمترین باکتریهای با 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 نسبتا متمایز به عنوان شاخص در نظر گرفته می‌شوند (Liu et al., 2018). جداسازی انتخابی این باکتری‌های شاخص و ارزیابی فعالیت سیتوتوکسیک و آنتی اکسیدانی آنها می تواند چشم اندازی از نقش باکتریها در اسفنج‌های میزبان تبیین نماید. مطالعات مختلفی در زمینه جداسازی و ارزیابی فعالیت ضد میکروبی، آنتی اکسیدانی و سیتوتوکسیک اکتینوباکتریها در رسوبات خلیج فارس (Gozari et al., 2016Gozari et al., 2018a ;) و دریای عمان (Gozari et al., 2019cGozari et al., 2019a ;) و همچنین در ارگانیسم‌های چون خیار دریایی در خلیج فارس انجام شده است (Gozari et al., 2018b). لیکن در زمینه اکتینوباکتری‌های مرتبط با اسفنج های 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 فیزیکوشیمیایی منحصر به فرد می باشد. دمای آب و شوری نسبتا بالا آن و همچنین وجود آلاینده‌های آلی و فلزات سنگین که می-تواند موجب ایجاد استرس اکسیداتیو در ارگانیسم های 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 می باشد (Riegl and Purkis, 2012).

در این مطالعه جمعیت های اسفنج پیرامون جزیره لارک به عنوان منبع غربالگری انتخاب گردید. جمعیت های اسفنج این جزیره از متنوع ترین کلونی های اسفنج در خلیج فارس می باشند. اهداف پژوهش حاضر شامل دستیابی به بیشترین میزان فراوانی و تنوع زیستی اکتینوباکتریهای مرتبط با اسفنج ها با ارائه یک فرایند جداسازی انتخابی بود. دومین هدف این مطالعه ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی و سیتوتوکسیک اکتینوباکتری‌های مرتبط با اسفنج‌های جمع آوری 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

انجام شد. بیش از ۲۰ نمونه اسفنج بوسیله غواصی جمع آوری 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 جمع آوری 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

۲-۲-۱ 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 اسفنج ها در زیر هود لامینار به مدت دو هفته (Jensen et al., 2005)، تیمار پرتو فرابنفش با طول موج ۲۵۴ nm در فاصله cm ۲۰ از بافت اسفنج به مدت ۳۰ ثانیه (Bredholdt et al., 2007)، تیمار سوسپانسیون بافت هموژن شده اسفنج با امواج فراصوت ۴۰KHZ به مدت دو دقیقه در دمای ۳۰°C (Qiu et al., 2008)، تیمار فریز کردن بافت اسفنج در دمای۲۱°C- به مدت ۲۴ ساعت انجام شد (Jensen et al., 2005). تیمار شیمیایی با افزودن فنول در غلظت نهایی ۱/۵درصد به سوسپانسیون همژن شده بافت اسفنج به مدت ۳۰ دقیقه در۳۰°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 زوبل آگار (MZA) حاوی پپتون ۰/۵٪، عصاره مخمر ۰/۱٪، کلرید منیزیم ($MgCl_2$) ۰/۸٪، کلرید کلسیم ($CaCl_2$) ۱/۶٪، آگار ۱/۵ ٪ در آب دریا فیلتر شده; محیط کشت نشاسته کازئین نیترات آگار (SCNA) حاوی نشاسته۱ ٪، کازئین ۰/۰۳ ٪، نیترات پتاسیم (KNO_3) ۰/۲٪، دی پتاسیم هیدروژن فسفات (K_2HPO_4) ۰/۲٪، سولفات منیزیم ۷ آبه ($MgSO_4.\ 7H_2O$)۰/۰۰۵٪، کربنات کلسیم ($CaCO_3$) =۰/۰۰۲٪، سولفات آهن ۷ آبه ($FeSO_4\ .\ 7H_2O$) 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_2HPO_4) 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).

۲-۳ شناسایی جدایه های 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 جدایه ها بر اساس شباهت به این جنس به دو دسته شبیه *Streptomyces* و متفاوت از *Streptomyces* تقسیم بندی شدند (Bredholt et al., 2008).

۲-۴ استخراج متابولیت‌های زیست‌فعال از محیط کشت

کلونی های 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).

۲-۵ سنجش فعالیت آنتی اکسیدانی متابولیت های استخراج شده

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

استفاده از روش سنجش مهار رادیکال‌های آزاد DPPH به‌صورت مایکرودایلوشن سنجش شد.

متابولیت های دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیش از ۹۰ درصد به‌منظور تعیین IC_{50} در غلظت‌های نهایی ۶۲۵ µg/ml ، ۳۱۲، ۱۵۶، ۷۸، ۳۹، ۱۹ مورد سنجش قرار گرفتند. از آسکوربیک اسید به‌عنوان ماده استاندارد و از متانول به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد. همچنین از عصاره آلی محیط کشت باکتری به‌عنوان 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) اندازه گیری شد. درصد فعالیت مهار رادیکال‌های آزاد DPPH با استفاده از معادله زیر محاسبه گردید (Leong and Shui, 2002).

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

I_0: جذب در چاهک حاوی DPPH ۱۹۵ µl + ۵ µl متانول

I_{sample}: جذب در چاهک نمونه یا کنترل

۲-۶ سنجش فعالیت سیتوتوکسیک متابولیت های استخراج شده

فعالیت سیتوتوکسیک متابولیت‌های استخراج‌شده 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 تهیه‌شده از شرکت INVE بلژیک در یک ارلن حاوی دو لیتر آب دریا فیلتر شده با شوری ۳۰ ppt تلقیح شد. انکوباسیون در محدوده $^{\circ}C$ ۲۹– ۲۲ در معرض نور سفید و با هوادهی به مدت ۴۸ ساعت انجام گرفت. پس از جمع‌آوری سلول‌های ناپلی، سوسپانسیونی با تراکم ۱۵۰–۱۰۰ ناپلی در میلی‌لیتر تهیه شد. به دنبال آن ۱۰۰µl از سوسپانسیون مذکور به ۱۰۰ µl محلول عصاره با غلظت نهایی ۱۰۰۰ µg/ml در هر چاهک افزوده شد. پس از گرماگذاری در $^{\circ}C$ ۲۵ به مدت ۲۴ ساعت، تعداد ناپلی‌های زنده و مرده ثبت گردید. از متانول به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد. به‌منظور تعیین LC_{50} جدایه‌های دارای بیشترین فعالیت سیتوتوکسیک، رقیق‌سازی در غلظت‌های پایین‌تر شامل ۵۰۰µg/ml، ۲۵۰، ۱۲۵ و ۶۲/۵ انجام شد.

درصد فعالیت سیتوتوکسیک = $[(N_{control}) - (N_{test})/ (N_{control})] \times 100$

N_{test}: تعداد ناپلی زنده در چاهک تیمار شده

$N_{control}$: تعداد ناپلی زنده در چاهک تیمار نشد

۲-۷ آنالیز آماری

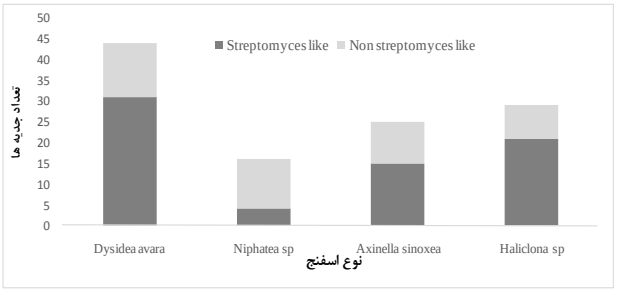
آزمون‌های صورت گرفته با سه تکرار انجام شد. آنالیز داده‌های بدست آمده از فرایند جداسازی باکتری‌ها با استفاده از نرم‌افزار Microsoft $_{TM}$ Excel 2013 (Microsoft, Seattle, WA) محاسبه شد. داده های سنجش فعالیت سیتوتوکسیک و آنتی-اکسیدانی به‌صورت میانگین±خطای استاندارد (SE) ارائه گردید. IC_{50} و LC_{50} در سطوح اطمینان ۹۵٪ به‌وسیله رگرسیون غیرخطی با استفاده از نرم‌افزار Graphpad (GraphPad Software, Inc.) prism 6 محاسبه گردید.

۳. نتایج و بحث

بررسی ویژگی های مورفولوژیک نمونه های اسفنج بیانگر تعلق آنها به چهار گونه شامل *Axinella sinoxea*، *Dysidea avara*، *Niphatea* sp. و *Haliclona* sp. بود (شکل ۱). طراحی و بهینه سازی 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 ۱۱۴جدایه اکتینوباکتری گردید. نتایج الگوی فراوانی اکتینوباکتری‌ها نشان داد بیشترین تعداد جدایه های اکتینوباکتری از گونه *Dysidea avara* با ۴۴ جدایه معادل ۳۸/۵۹ درصد و بدنبال آن از گونه‌های *Haliclona* sp.، *Axinella sinoxea* و *Niphatea* sp. بترتیب (٪ ۲۵/۴۳) ۲۹، (٪ ۲۱/۹۲) ۲۵ و (٪ ۱۴/۰۳) ۱۶ جدایه جداسازی گردید.

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

نتایج الگوی تنوع اکتینوباکتری‌ها در نمونه‌های اسفنج از نظر شباهت به جنس *Streptomyces* بیانگر حضور گسترده جدایه‌های شبیه به *Streptomyces* در همه نمونه های مورد بررسی به استثنای جنس *Niphatea* sp. بود (شکل ۲). بطوریکه جدایه‌های شبیه به *Streptomyces* بیش از ۷۰ درصد جدایه های 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 جدایه ها غیر استرپتومایسس بودند (شکل ۲).این الگوی تنوع زیستی می تواند تابع متغییرهای پیچیده ای 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). نتایج 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 اکتیتوباکتری‌های مرتبط با اسفنج *Dendrilla nigra* غالب بودن استرپتومایسس‌ها به میزان ۲۳/۹۱ درصد کل جدایه‌های اکتینوباکتری گزارش شد (Selvin et al., 2009).

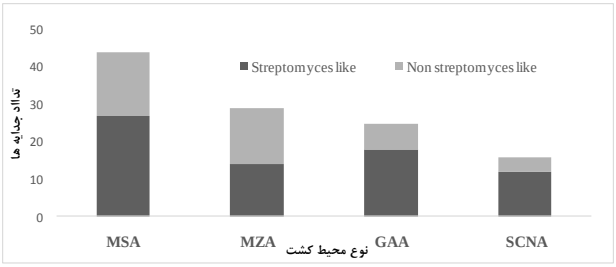


شکل ۲: میزان حضور اکتینوباکتری‌های قابل کشت در اسفنج‌های نمونه‌برداری شده

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

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 می دهد.

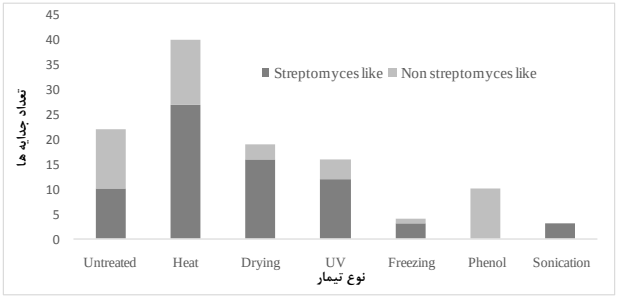
نتایج تاثیر فرمولاسیون چهار محیط کشت مختلف بر فراوانی و تنوع اکتینوباکتری‌ها نشان داد محیط کشت اسفنج دریایی آگار (MSA) با جداسازی (٪۳۸/۵۹) ۴۴ جدایه بیشترین کارایی را در نشان داد. محیط‌های کشت مارین زوبل آگار (MZA) ، گلیسرول آرژینین آگار (GAA) ، نشاسته کازئین نیترات آگار (SCNA) با جداسازی بترتیب (٪ ۲۵/۴۳) 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 جداشده به تفکیک تشابه یا عدم تشابه با استرپتومایسس‌ها بیانگر جداسازی تنوع زیستی بیشتری از اکتینوباکتریها در محیط‌های کشت MSA و MZA با جداسازی بترتیب ۳۸/۶۳ و ۵۱/۷۲ درصد از جدایه های غیر استرپتومایسس بود. در صورتی که درمحیط کشت های SCNA و GAA بترتیب ۷۵ و ۷۲ درصد جدایه ها متعلق به استرپتومایسس ها بودند. مشاهدات ماکروسکوپی و میکروسکوپی مورفوتایپ های متنوعی را در این دو محیط کشت MSA و MZA نشان داد. وجود عصاره آبی بافت اسفنج میزبان در محیط کشت MSA می تواند 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 آسیل 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 می گردند. افزودن این ترکیبات به محیط کشت جداسازی می‌تواند باعث افزایش قابلیت کشت پذیری و رشد باکتریهای همزیست گردد (Bruns et al., 2002). عصاره اسفنج میزبان می تواند حاوی القاء کننده های انتخابی مذکور باشد و با افزودن آنها به محیط کشت جداسازی می توان 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 می تواند 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 می تواند 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 می دهند. در مطالعه دیگری نیز تیمار با فنول منجر به افزایش جداسازی گونه‌های

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_{50} فعالیت آنتی اکسیدانی 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_{50} ±SE (µg/ml)	جدایه	IC_{50} ±SE (µg/ml)	جدایه	IC_{50} ±SE (µg/ml)
SP* ۱۸	۵۱۱/۱± ۱۲/۱۳	SP ۶۴	۶۱۵/۲± ۲۱/۴۲	SP ۹۰	۷۷۵/۳۴± ۱۸/۷۱
SP ۱۹	۳۱۱/۶± ۲۱/۵۲	SP ۶۵	۴۲۳/۱±۱۲/۰۳	SP ۹۴	۵۱۴/۱±۲۹/۰۲
SP ۳۴	۵۳۱/۴± ۲۳/۴۶	SP ۶۶	۳۸۳/۲±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	۳۴۷/۸±۲۹/۳۲	SP ۱۰۰	۳۴۱/۸±۲۹/۱۲
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	۳۴۱/۱±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 اسفنج های میزبان می باشد. وجود سطوح بالای گونه-های اکسیژن فعال (ROS) در بی مهرگان دریایی تهدیدی بالقوه برای ارگانیسم محسوب می گردد. به همین دلیل اسفنج های دریایی ناگزیر به اتخاذ استراتژی های دفاعی به منظور خنثی سازی سطوح بالای ROS با استفاده از تولید ترکیبات آنتی اکسیدان می باشند (Velho-Pereira et al. 2015). در مطالعات مختلف نیز فعالیت آنتی اکسیدانی بسیاری از متابولیت های استخراج شده از بی مهرگان دریایی گزارش شده است. به عنوان نمونه در مطالعه دیگری Motohashi و همکارانش موفق به شناسایی دو پپتید با فعالیت آنتی اکسیدانی بالا به نامهای JBIR-34و 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 LC50 فعالیت سیتوتوکسیک متابولیت های استخراج شده از جدایه های 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 بهره برداری اسفنج‌ها 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 می نماید. مطالعات مختلف نیز عملکرد حیاتی اکتینوباکتریها را در اسفنج-های میزبان تایید نموده اند (Hildebrand et al., 2004).

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

جدایه	LC_{50} ±SE (µg/ml)	جدایه	LC_{50} ±SE (µg/ml)	جدایه	LC_{50} ±SE (µg/ml)
SP ۱۸	۱۷/۲۳ ۳۵۳/۵۲±	SP۶۴	۳۱۷/۱۲±۲۷/۳۴	SP۹۵	۱۶/۲۱ ۱۳۱/۵۱±
SP۱۹	۰۳/۲۵۹/۰۱±۱۳	SP۶۵	۱۲/۳۲ ۳۶۵/۱۲±	SP۹۹	۱۵/۴۱۶/۱±۳۳
SP۳۴	۱۶۰/۳۱±۴۱/۰۱	SP۷۴	۱۸۲/۵۰±۱۷/۴۵	SP۱۰۰	۳۴۷/۱±۱۴/۱۴
SP۳۷	۱۳۴/۵۱±۱۸/۲۳	SP۷۶	۱۵۶/۴۱±۸/۱۹	SP۱۰۴	۴۲/۲۲ ۲۸۵/۱±
SP۳۸	۸۷/۳۳ ۷۸۲/۳۲±	SP۷۸	۹۶/۲۱±۱۳/۱۰	SP۱۰۷	۱۷۴/۴۱±۵۶/۵۰
SP۴۴	۴۳/۴۵۲/۰۹±۱۴	SP۸۵	۶۵/۱۵±۷/۲۰	SP۱۰۹	۱۹۸/۰۱±۲۱/۶۴
SP۴۸	۵۲۱/۰۴±۳۲/۳۴	SP۹۰	۱۲/۱۲ ۵۱۵/۱۶±		
SP۵۴	۱۲/۲۳ ۳۶۰/۳±	SP۹۴	۳۲/۲۲ ۴۳۵/۱۸±		

تعیین میزان LC_{50} متابولیت های استخراج شده بیانگر فعالیت سیتوتوکسیک بالای آنها بود. به ویژه جدایه SP ۸۵ با LC_{50} معادل ۶۵/۱۵ µg/ml بیشترین فعالیت سیتوتوکسیک را نشان داد. فعالیت سیتوتوکسیک بالای متابولیتهای استخراج شده از اکتینوباکتریهای مرتبط با اسفنج ها در سایر مطالعات نیز به اثبات رسیده و ترکیبات دارویی بسیاری از آنها گزارش شده است (Carroll et al., 2019; Mehbub 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_{50} 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 محیط های کشت مختلف را به منظور انتخابی نمودن فرایند جداسازی اکتینوباکتریها ارائه نمود. همچنین بر اساس نتایج الگوی فعالیت آنتی اکسیدانی و سیتوتوکسیک بدست آمده حضور اکتینوباکتریها به عنوان بخشی فعال از میکروبیوتای مرتبط با اسفنج‌های جمع آوری شده تایید گردید. جدایه‌های بدست آمده می‌توانند منبع نویدبخشی جهت ادامه مطالعات در زمینه شناسایی ترکیبات آنتی‌اکسیدان و سیتوتوکسیک باشند.

۵. سپاسگزاری

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

منابع

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: 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:

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.; Muhando, 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 Meuseum: 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